

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**ESTUDIO MOLECULAR DEL RECONOCIMIENTO
MATERNAL, ADHESIÓN Y NEOVASCULARIZACIÓN EN LA
PERI-IMPLANTACIÓN OVINA EN DOS TRATAMIENTOS
DE SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Irene Ruiz González

Bajo la dirección de los doctores

Juana María Flores Landeira
Rosa Ana García Fernández
M^a Ángeles Sánchez Pérez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL



ESTUDIO MOLECULAR
DEL RECONOCIMIENTO MATERNAL,
ADHESIÓN Y NEOVASCULARIZACIÓN
EN LA PERI-IMPLANTACIÓN OVINA
EN DOS TRATAMIENTOS DE
SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO

TESIS DOCTORAL

IRENE RUIZ GONZÁLEZ
MADRID, 2012



Universidad Complutense de Madrid
Dpto. Medicina y Cirugía
Animal

D^a Juana María Flores Landeira, con D.N.I. 50282989K, Catedrática del Área de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

D^a Rosa Ana García Fernández, con D.N.I. 09777583F, Profesora Titular del Área de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

D^a M^a Ángeles Sánchez Pérez con D.N.I. 50822212D, Profesora Titular del Área de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Estudio molecular del reconocimiento maternal, adhesión y neovascularización en la peri-implantación ovina en dos tratamientos de sincronización del estro*”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a Irene Ruiz González.

Revisado el presente trabajo, consideran que consta de la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 2012

Juana María Flores Landeira Rosa Ana García Fernández M^a Ángeles Sánchez Pérez

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2005-02669, otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España.

La autora ha disfrutado de una beca predoctoral del programa “Formación del Profesorado Universitario” (F.P.U.) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España. Período Julio 2008-Julio 2012.

*A todos aquellos que han colaborado,
de una forma u otra,
en la realización de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tres directoras de Tesis, Juana M^a Flores, Rosa Ana García y M^a Angeles Sánchez, el trabajo y tiempo invertidos en mi formación como doctorando durante estos últimos cuatro años. Nani, gracias por brindarme la oportunidad de entrar a formar parte de tu grupo de investigación y por poner a mi disposición todo lo que he necesitado durante la realización de la Tesis. Rosa, gracias por tu amistad y por contestar siempre a mis dudas y preguntas con una sonrisa, sin importar el momento o las veces que tuvieras que repetirme las cosas. Nines, gracias por adoptar a la palmera y asegurar su aprendizaje del idioma y cultura popular castellana. Sólo me llevo buenos momentos.

Por supuesto, a Belén y Pilar, por su maternal acogida cuando aterricé en el S014, siempre intentando crear un ambiente cómodo y alegre. Gracias a Eduardo y su capacidad de técnico-electricista-informático. A M^a Ángeles, por servir de apoyo dentro y fuera de la facul. A toda la Unidad, por permitirme colaborar en la docencia de las diferentes asignaturas y contribuir en mi formación dentro del área de la Histología y Anatomía Patológica. También a Pedro, Fernando, Vane, Ramón y Nacho, por todo su trabajo y por amenizar las horas pasadas en el laboratorio o en la sala.

A Paloma Forés, por iniciarme en esto de la investigación.

Agradecer al Departamento de Apoyo a la Investigación del Área de Informática U.C.M., especialmente a Pedro Cuesta, por el manejo estadístico de los datos de esta Tesis y por su paciencia a la hora de hacerse entender.

Muchísimas gracias al personal y becarios del Dpt. de *Animal Science* de la Universidad de Texas A&M, en especial a Dr. Bazer, Dr. Spencer, KA. Dunlap, MC Satterfield, Megan, Sorin, Brian y Tyler, por acogerme como uno más durante mi estancia y por todo lo aprendido con ellos.

A mi familia, por su apoyo incondicional desde la distancia. Gracias por estar siempre ahí y contribuir en la causa, pensando únicamente en lo que podía ser mejor para mí.

Cómo no, a mis amigas: Marta Cuenca, Leti, Toyita, Marta Noval, Ana Pou, Mercedes, Eva...cada una por un camino diferente, y aún así, presentes en el día a día, apoyándome y haciendo mi vida como doctorando mucho más llevadera.

Dedicárselo también a Adri-TeamManager, y por supuesto a Maca y Luckys. Gracias por esos momentos en el Tex y por las partidas de cartas que han permitido fundar toda una Institución, el ChiliTeam.

A Diego, por cruzarte en el camino y decidir que valía la pena andarlo conmigo...

A todos los que se me puedan quedar en el tintero, gracias.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Summary.....	III
Listado de Abreviaturas.....	V
Introducción y Objetivos.....	1
Revisión bibliográfica.....	7
1. Ciclo estral ovino.....	9
Fase folicular.....	9
Fase Luteal.....	10
2. Actividad uterina durante el ciclo estral.....	11
Papel de las hormonas esteroides ováricas sobre el útero.....	12
RP.....	14
RE.....	14
Papel de la oxitocina y su receptor ROT sobre el útero.....	15
Papel de la prostaglandina F _{2α} en el útero.....	16
3. Gestación.....	17
Pre-implantación embrionaria.....	17
Reconocimiento maternal de gestación.....	19
Implantación.....	21
Placentación.....	24

4. Pérdidas embrionarias.....	27
5. Tratamientos de sincronización del ciclo estral.....	28
Protocolos basados en progestágenos.....	28
Protocolos basados en prostaglandinas.....	30
Situación actual en cuanto a la utilización de ambos protocolos.....	31

Material y Métodos.....33

1. Manejo reproductivo de los animales.....	35
2. Valoración de la sintomatología de celo.....	35
3. Análisis de la progesterona plasmática.....	36
4. Toma de muestras y procesado.....	36
Procesado de las muestras.....	37
Técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina peroxidasa convencional.....	39
Técnica inmunohistoquímica mediante otros sistemas de detección diferentes a la estreptavidina-biotina peroxidasa.....	42
Valoración de la inmunotinción.....	45
5. Estudio estadístico.....	46

Resultados.....47

1. Evaluación de la concentración plasmática de progesterona durante la fase post-ovulatoria y gestación tempranas.....	49
2. Expresión uterina de receptores de progesterona, de estrógeno-alfa, de interferón tipo I y de oxitocina durante la fase de reconocimiento maternal de la gestación.....	50
Expresión uterina de RP.....	50
Expresión uterina de IFNAR1.....	52
Expresión uterina de RE- α	53
Expresión uterina de ROT.....	55
Correlación existente entre la expresión uterina de RP, IFNAR, RE- α y ROT.....	57
3. Expresión de L-Selectina (CD62L) y su ligando CD34 en los compartimentos epiteliales uterinos durante el periodo de adhesión e implantación temprana.....	58
Expresión de L-Selectina.....	58
Expresión de CD34.....	59
4. Expresión del Factor de crecimiento del endotelio vascular, CD31 y Factor von Willebrand en los vasos del estroma caruncular durante la placentación temprana.....	60
Expresión de VEGF.....	60
Expresión de CD31.....	62
Expresión de vWF.....	64

Iconografía.....67

Discusión.....	83
1. Niveles plasmáticos de progesterona.....	85
2. Reconocimiento maternal de la gestación.....	87
3. Adhesión embrionaria e implantación temprana.....	92
4. Placentación temprana.....	95
Conclusiones.....	99
Bibliografía.....	104
Anexo.....	131

RESUMEN

En la especie ovina, los protocolos de sincronización de celo basados en progestágenos son comúnmente utilizados a pesar de que su eficacia es menor si se compara con el celo natural. Este hecho, sumado a la polémica que plantea su utilización por generar residuos hormonales en las canales, hace que el empleo de análogos de prostaglandinas surja como una opción alternativa, aunque su mayor eficacia respecto a la de los progestágenos está todavía por determinar.

Esta Tesis Doctoral se propone comparar ambos tratamientos durante la gestación temprana ovina, analizando la expresión de diferentes elementos que intervienen en la respuesta del medio uterino durante este periodo, caracterizado por incluir las fases de reconocimiento maternal de la gestación, adhesión del embrión e inicio de la placentación. Para ello, hemos determinado la concentración post-ovulatoria de progesterona plasmática hasta el día 21 post-coito (pc) en ovejas sincronizadas con progestágenos (Grupo P) y con análogos de prostaglandinas (Grupo PG), así como la inmunoexpresión del receptor de progesterona (RP), receptor de interferón tipo I (IFNAR), receptor de estrógenos-alfa (RE- α) y receptor de oxitocina (ROT) en diferentes compartimentos celulares del útero entre los días 9 y 21pc. Con el mismo fin, se analizó la expresión de la molécula de adhesión L-Selectina (CD62L) y su ligando CD34, así como de los marcadores vasculares y de angiogénesis CD31, Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el Factor von Willebrand (vWF) entre los días 15 y 21pc.

La concentración plasmática de progesterona fue mayor en el grupo PG, fundamentalmente en los días 10 y 16pc ($P<0.05$), lo que podría propiciar la preparación uterina para la gestación y un mayor desarrollo del embrión. Además, el nivel de progesterona aumentó de manera significativa en los días 1pc ($P<0.05$), 3pc ($P<0.05$), 8pc ($P<0.01$) y 9pc ($P<0.001$) en ambos grupos, para luego continuar de manera más constante hasta el día 21pc.

La expresión de RP fue similar en los dos tratamientos, existiendo interacción estadística día x tratamiento únicamente en el estroma caruncular ($P=0.027$) y en el miometrio ($P=0.000$). En ambos grupos, RP decreció desde el día 9pc al 21pc ($P<0.01$), excepto en el estroma caruncular, donde RP aumentó $P<0.01$, y en el estroma no caruncular, estroma profundo y miometrio, donde su expresión se mantuvo. IFNAR mostró niveles superiores en el epitelio luminal no caruncular del grupo PG ($P=0.05$), lo que podría indicar una mayor sensibilidad a la concentración creciente de IFN- τ en este grupo. Además, a diferencia de los compartimentos glandulares, la expresión de IFNAR varió en el epitelio luminal (caruncular y no caruncular) de ambos tratamientos ($P<0.05$), lo que se relaciona con el estrecho contacto que mantiene este estrato con el embrión en la implantación. Por otro lado, aunque el patrón de RE- α mostró una interacción día x tratamiento en el estroma superficial ($P=0.05$), su expresión fue similar en ambos grupos, con un descenso desde el día 9 al 21pc en todos los compartimentos uterinos analizados ($P<0.01$), probablemente fruto de la acción conjunta de la progesterona y el IFN- τ mediado por IFNAR. La expresión de ROT fue similar en los dos grupos, con una disminución significativa entre los días 9 y 21pc en los compartimentos superficiales ($P<0.05$), derivada del bloqueo de IFN- τ sobre RE- α en este estrato.

Por otra parte, la expresión de L-Selectina y de CD34 no mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos experimentales ni variaciones entre los días de gestación, lo que podría indicar que las células epiteliales del útero ovino expresan estas moléculas de forma constitutiva.

El estudio de los marcadores vasculares en el estroma caruncular mostró que la densidad de vasos totales ($P=0.007$) y estructuras capilares ($P=0.014$) positivas a CD31 disminuyó de forma similar entre los días 15 y 21pc, lo que podría indicar un fuerte estímulo angiogénico inicial y una gran proliferación de neovasos alrededor del día 15pc. En el grupo P, la densidad de capilares positivos a VEGF fue superior ($P<0.045$), lo que podría relacionarse con un mayor estímulo de remodelación sobre los vasos neoformados para evolucionar a vasos de mayor calibre. Aunque la expresión de vWF fue semejante en los dos grupos experimentales, en el grupo PG existió un ligero incremento alrededor del día 21pc, lo que podría indicar una predominancia de los fenómenos de maduración y envejecimiento vascular en los animales de este grupo.

Las diferencias encontradas entre los dos tratamientos de sincronización indican una influencia similar de ambos protocolos sobre la respuesta del útero durante la gestación temprana ovina. Sin embargo, mientras que el tratamiento basado en análogos de prostaglandinas induce una mejor preparación del útero para recibir al embrión, la aplicación de progestágenos favorece el intercambio metabólico materno-fetal debido a una mayor receptividad a la progesterona y un mayor desarrollo vascular a nivel caruncular.

SUMMARY

In the ewe, hormonal treatments based in progestagens are commonly used for estrus synchronization. However, poorer results have been demonstrated when compared to the natural cycle. In addition, there is a current controversy about the hormonal residues permitted in animal products in order to ensure consumers health. Thus, protocols based in prostaglandin analogues have been proposed as an alternative to progestagens for ovine cycle synchronization, although their apparent greater efficiency is still under revision.

The present Doctoral Thesis focuses in the comparative study of both synchronization treatments during ovine early pregnancy, through the analysis of different elements involved in the uterine response to gestation establishment and peri-implantation period, which encloses maternal recognition of pregnancy, conceptus adhesion and beginning of placentation. To fulfil this objective, post-ovulatory plasma concentration of progesterone was determined until day 21 post-coitus (pc) in a flock of ewes either synchronized with progestagens (Group P) or with prostaglandin analogues (Group PG), along with progesterone receptor (PR), Type I Interferon receptor (IFNAR), estrogen receptor-alpha (RE- α) and oxytocin receptor (OTR) immunoexpression in different cellular compartments of the pregnant uterus within days 9 to 21pc. Furthermore, expression of both immunoreactive L-Selectin adhesion molecule and its ligand CD34 have been assessed, as well as the positivity of Vascular endothelial growth factor (VEGF), CD31 and von Willebrand Factor (vWF) in endometrial caruncular vessels within days 15 to 21pc.

Plasma progesterone was higher in Group PG, especially on days 10 y 16pc ($P<0.05$), which could enhance uterine preparation to pregnancy and embryo development. Moreover, progesterone levels rose significantly on days 1pc ($P<0.05$), 3pc ($P<0.05$), 8pc ($P<0.01$) y 9pc ($P<0.001$) in both groups of treatment, to keep arising less notoriously until day 21pc.

Although PR demonstrated an interaction day x treatment in the caruncular stroma ($P=0.027$) and myometrium ($P=0.000$), its pattern of expression was similar in both treatments. PR decreased in all uterine compartments from day 9 to 21pc ($P<0.01$), with the exception of the caruncular stroma, where it increased, $P<0.01$, and the non caruncular stroma, deep stroma and myometrium, where PR expression was sustained. Stronger IFNAR immunoexpression in the non caruncular luminal epithelium was demonstrated in the PG group ($P=0.05$), which could be translated in a higher sensitivity to the increasing IFN- τ levels. In opposition to the glandular compartments, IFNAR varied significantly in the luminal epithelium (caruncular and non caruncular) of both treatments when comparing days of pregnancy ($P<0.05$). This could be related to the close contact that this compartment maintains with the embryo during implantation.

Although ER- α pattern demonstrated an interaction day x treatment in the non caruncular stroma ($P=0.05$), its expression was similar in both groups of analysis, decreasing from day 9pc to 21pc in all uterine compartments studied ($P<0.01$), probably due to the combined effect of progesterone and IFNAR-mediated IFN- τ . Expression of OTR paralleled in the two treatments, decreasing significantly between days 9 to 21pc in uterine superficial compartments ($P<0.05$) due to the IFN- τ blocking activity over ER- α expression.

Furthermore, L-Selectin and CD34 immunostaining did not show significant differences between both groups of analysis or days of pregnancy. Therefore, this maintenance could indicate a constitutive expression in ovine uterine epithelial cells.

Assessment of the caruncular stroma vascular staining demonstrated that CD31 decreased similarly in both groups, as its total vascular ($P=0.007$) and capillary ($P=0.014$) densities were reduced from day 15pc to 21pc, illustrating an initial angiogenic stimulus that would result in a neovessels proliferation around day 15 of pregnancy. Stronger VEGF capillary density was observed in the group P ($P<0.045$), which could indicate an active remodeling of the newly formed vascular structures, in order to evolve into bigger diameter and mature vessels. Although vWF staining was alike in both treatments, its expression in the group PG increased slightly around day 21pc, which could be pointing out an ongoing prevalence of the processes of vascular maturation and aging over the caruncular vessels in these animals.

The differences observed between both treatments indicate similar influence over the endometrial response to pregnancy establishment in the ewe. However, although synchronization with prostaglandin analogues induces better uterine preparation for the embryo's arrival, a protocol based in progestagens enhances the maternal-fetal inter-exchange through the placental tissue, due to a higher receptivity to progesterone and an increased vascular development at the caruncular lever.

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo.
ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.
CL: cuerpo lúteo.
COX: enzima ciclooxigenasa.
DAB: 3,3'-tetracloruro de diaminobencidina.
E₂: estradiol.
EDTA: ácido etileno diamina tetra-acético.
EGp: epitelio glandular profundo.
EGs: epitelio glandular superficial.
ELc: epitelio luminal caruncular.
ELnc: epitelio luminal no caruncular.
ESc: estroma caruncular.
ESnc: estroma no caruncular.
ESp: estroma profundo.
FGA: acetato de fluorogestona.
FSH: hormona folículo estimulante.
GlyCAM-1: *Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1*
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.
Grupo P: tratamiento con progestágenos.
Grupo PG: tratamiento con análogos de prostaglandinas.
IFN- τ : Interferón-tau
IFNAR: receptor de interferones de tipo I.
Ig: Inmunoglobulina.
i.m.: intramuscular.
INIA: Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria.
ISGs: genes estimulados por interferón.
LH: hormona luteinizante.
LMR: Limite Máximo de Residuos.
min: minutos.
Mio: miometrio.
Mm: milimolar.
pc: post-coito.
P₄: progesterona.
PBS: tampón fosfato salino.
PECAM-1 (CD31): *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*.
PGF_{2 α} : prostaglandina F_{2 α} .
PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante.
RE- α : receptor de estrógenos alfa, *ESR1*.
RE- β : receptor de estrógenos beta, *ESR2*.
ROT: receptor de oxitocina.
RP: receptor de progesterona.
RPm- α : receptor RP de membrana.
T^a Amb: temperatura ambiente.
TBS: Tampón trifosfato salino.
UGKO: *Uterine Gland Knock-Out*.
VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
vWF: Factor von Willebrand.

Introducción y Objetivos

En las industrias dedicadas a la producción animal, uno de los principales objetivos es un adecuado manejo reproductivo con el fin de optimizar su rendimiento y conseguir unos resultados más eficientes. Entre las tecnologías de la reproducción, la sincronización de celos y el control de la duración del ciclo estral por medio de tratamientos hormonales constituye una de las herramientas más utilizadas [1]. En la especie ovina, el protocolo de sincronización convencionalmente empleado se basa en el uso de esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos que prolongan la fase luteal del ciclo, a pesar de que los resultados obtenidos al estudiar la dinámica preovulatoria y la viabilidad embrionaria temprana demuestran ser menos eficaces en comparación con el celo natural [2].

La utilización de los tratamientos hormonales tradicionales también plantea otros problemas relacionados con la presencia de residuos en las canales, por lo que están sometidos a un intenso control en la Unión Europea. Todo ello hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos como los protocolos basados en la aplicación de análogos de prostaglandinas, los cuales actúan como inductores de una luteolisis prematura, pudiendo utilizarse únicamente durante la estación reproductiva [3-5].

Ambos tipos de tratamientos presentan ventajas e inconvenientes, por lo que hasta el momento no se ha establecido cual de los dos sería más eficaz en la especie ovina. Aunque los progestágenos presentan la gran ventaja de poder utilizarse tanto en época reproductiva como en anestro, su aplicación conlleva una eficiencia variable según el protocolo utilizado [6,7], así como problemas derivados de la pérdida de los dispositivos intravaginales, vaginitis, retención de la esponja o la no asimilación del contenido total del compuesto [8].

Por otro lado, los protocolos basados en prostaglandinas y sus análogos presentan la ventaja de no generar productos residuales debido a que se metabolizan rápidamente por vía pulmonar, lo que permite desarrollar una industria más ecológica [9]. Además, la fácil aplicación mediante inyección intramuscular elimina la problemática derivada del uso de las esponjas intravaginales. Sin embargo, suponen un elevado coste para la

explotación ganadera y su eficiencia depende del momento del ciclo en el que se aplique la inyección [10-13].

En trabajos previos al desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos encontrado diferencias en la fisiología ovárica y uterina durante el ciclo estral y en fases tempranas de la gestación que derivan del tratamiento de sincronización de celo utilizado.

Durante la fase folicular del ciclo, los niveles basales de hormona luteinizante (LH) fueron menores en animales tratados con progestágenos, además de observarse un pico preovulatorio de esta hormona más tardío que en los tratamientos con análogos de prostaglandinas [14]. Al evaluar la dinámica folicular preovulatoria se observó que los progestágenos producían mayores diámetros en el folículo dominante [2], aunque la tasa de crecimiento luteal y el tamaño final del cuerpo lúteo (CL) eran mayores en los animales sincronizados con análogos de prostaglandinas [15].

Así mismo, durante la gestación temprana, se observaron entre los días 2 y 21 post-coito (pc) mayores niveles de LH plasmática con el uso de progestágenos [16]. Al valorar las variaciones en la presencia de receptores de hormonas esteroides en el útero pre-implantacional (días 4 y 7 de gestación), se obtuvo una menor expresión endometrial de receptor de estrógenos alfa (RE- α) en el epitelio luminal, glándulas superficiales y estroma superficial al emplear el método de sincronización con progestágenos, al igual que ocurrió con la expresión del receptor de progesterona (RP), que fue menor en las glándulas superficiales con este tratamiento [17].

La presente Tesis Doctoral pretende, por tanto, profundizar en la influencia que los protocolos de sincronización de celo cotidianos (progestágenos y análogos de prostaglandinas) puedan tener sobre los procesos que acontecen en el ambiente materno durante la fase peri-implantacional de la gestación ovina, así como establecer posibles diferencias entre los mismos.

Es sabido que las hormonas esteroides, junto con sus receptores, desempeñan un papel protagonista en la regulación de los procesos reproductivos de los mamíferos. Tras haber encontrado diferencias entre ambos tratamientos al comparar la expresión de RP y RE- α en los días 4 y 7 pc, hemos considerado de interés su estudio en una fase más tardía de la gestación (días 9 a 21pc), coincidiendo con la llegada del embrión al útero. En este periodo se inicia la comunicación materno-embrionaria que permitirá el reconocimiento maternal de la gestación [18], estando mediado por Interferón-tau (IFN- τ), molécula secretada por el embrión entre los días 10 y 25 de gestación y considerada como la señal emitida por el mismo para indicar su presencia. Tras unirse a su receptor endometrial (IFNAR), IFN- τ inhibe la expresión uterina de RE- α y del receptor de oxitocina (ROT), inhabilitando la liberación de prostaglandina F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$), responsable del mecanismo luteolítico que iniciaría un nuevo ciclo [19]. Dada la importancia crucial de este proceso durante la gestación temprana ovina, hemos planteado en nuestro trabajo estudiar la expresión uterina de IFNAR y ROT, así como establecer diferencias en la misma al comparar los tratamientos de sincronización.

A medida que avanza la gestación, se inicia el proceso de unión del embrión a la superficie uterina. En la oveja, la implantación es de tipo superficial y comienza alrededor del día 15pc [20,21], formándose una placenta de tipo sinepiteliocorial. La aposición materno-fetal conlleva diversos fenómenos de adhesión que se engloban en la denominada “cascada de la implantación” [22] e implica a numerosas moléculas de adhesión [23-25], entre las que se incluye la L-selectina y sus ligandos GlyCAM-1 o CD34 [26-29]. También en este periodo gestacional, y con el fin de crear el vínculo que permita el aporte nutritivo necesario para el embrión en desarrollo, se inician los procesos de angiogénesis caruncular y neovascularización embrionaria [30,31]. El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) ha sido descrito como una de las moléculas más influyentes durante este periodo, y junto a otros marcadores de desarrollo vascular como CD31 y el Factor von Willebrand (vWF), han sido empleados como indicadores de los procesos de angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas. Por tanto, consideramos de interés en esta Tesis Doctoral el determinar la existencia de posibles discrepancias en la expresión de estas moléculas al comparar ovejas de ciclo sincronizado

con progestágenos o con análogos de prostaglandinas. Las diferencias observadas en esta Tesis podrían estar relacionadas con las variaciones en la eficiencia reproductiva descritas previamente por nuestro grupo, y por otros autores, tras comparar ambos protocolos de sincronización de celo en la especie ovina.

El **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral es conocer la influencia que puedan tener los protocolos de sincronización de celo comúnmente empleados en la especie ovina (progestágenos y análogos de prostaglandinas) sobre los procesos que acontecen en la gestación temprana: reconocimiento maternal de la gestación, adhesión materno-fetal y placentación endometrial temprana, así como valorar las diferencias existentes a fin de definir el tratamiento que presente mayores ventajas para la industria ganadera.

Para ello, se han desarrollado los siguientes **objetivos parciales**:

Objetivo 1: Valorar la producción de progesterona plasmática post-ovulatoria desde el día 0 al día 21 de gestación, así como estudiar los mecanismos de reconocimiento materno de la gestación mediante la inmunolocalización de RP, IFNAR1, RE- α y ROT en diferentes compartimentos del útero durante la fase gestacional temprana (días 9 a 21pc).

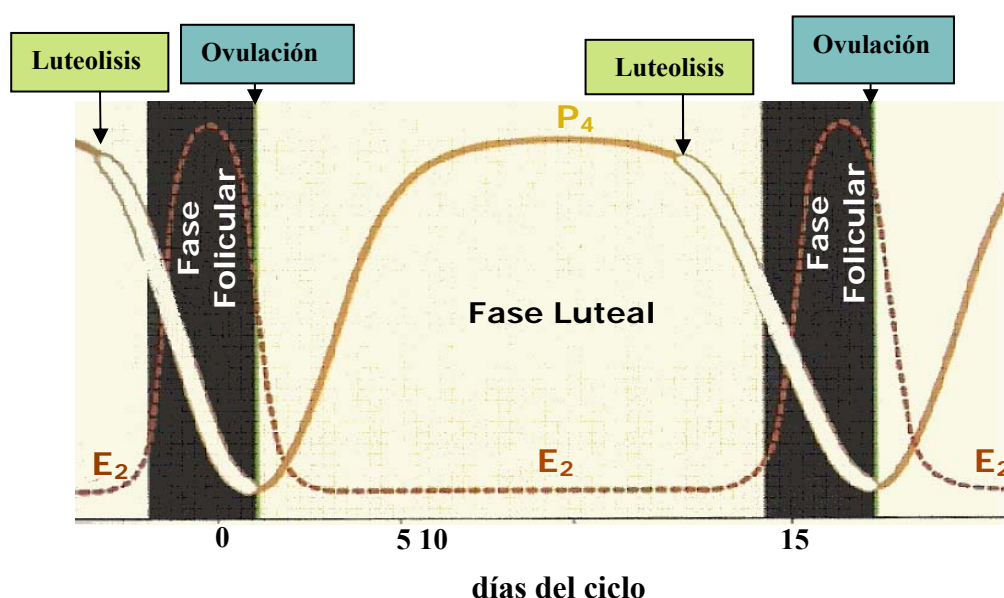
Objetivo 2: Estudiar el proceso de adhesión e implantación embrionaria mediante el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión L-Selectina y CD34 en diferentes compartimentos uterinos entre los días 15 a 21 de gestación.

Objetivo 3: Estudiar los fenómenos de angiogénesis caruncular que se producen durante la placentación temprana mediante el análisis de la inmunoexpresión vascular de VEGF, CD31 y vWF entre los días 15 y 21 de gestación.

Revisión Bibliográfica

1. CICLO ESTRAL OVINO

El periodo de actividad reproductiva en la especie ovina está centrado en las estaciones de otoño e invierno (especie poliéstrica estacional de días cortos) [32]. El ciclo estral tiene una duración aproximada de 17 días y está controlado principalmente por la actividad del ovario, de modo que se diferencian dos etapas (**Esquema 1**): la fase folicular, en la que los folículos en desarrollo secretan estradiol (E_2) [33-35] y la fase luteal, dominada por un cuerpo lúteo que produce progesterona (P_4) [36,37].



Esquema 1. Representación de las fases del ciclo estral ovino. E_2 , estradiol; P_4 , progesterona. Modificado a partir de Senger, 2003.

Fase folicular

Durante esta fase, los folículos primordiales evolucionan hacia un folículo ovulatorio tras haberse mantenido quiescentes en el ovario desde el nacimiento. El desarrollo folicular en la oveja ocurre en forma de ondas u oleadas, con 3 ó 4 ondas en cada ciclo estral [33]. En cada onda se diferencian varias etapas, distinguiéndose el

reclutamiento inicial a partir de folículos primordiales, la posterior selección de folículos viables, y la evolución final de un folículo dominante, mientras que el resto sufren regresión o atresia [34,35].

El fenómeno de reclutamiento ocurre sobre los folículos sensibles a gonadotropinas hipofisarias [38], distinguidos por su capacidad de iniciar la síntesis de hormonas esteroides en respuesta a las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) [34,39]. Los folículos seleccionados continúan creciendo hasta que uno de ellos adquiere dominancia, caracterizada por la liberación de una gran cantidad de E_2 que estimula la producción hipotalámica de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El folículo dominante también produce inhibina, la cual disminuye la síntesis de FSH [40], a la vez que se estimula la producción pulsátil de LH [34,41,42]. Estos pulsos de hormona luteinizante van aumentando de amplitud hasta que tiene lugar una gran descarga conocida como “pico preovulatorio de la LH” [43-46], a partir del cual se inician los fenómenos que conducen a la destrucción de la pared del folículo ovulatorio y a la liberación del oocito para que pueda ser fecundado (ovulación) [47].

Fase luteal

Tras la ovulación, los restos de la pared folicular se transforman en el cuerpo lúteo (CL) por acción de la LH. Las células foliculares se diferencian a células luteales [48,49], cuya capacidad esteroideogénica se centra en la producción de P_4 . La liberación de progesterona por el CL está mantenida por la acción de una variedad de hormonas denominadas luteotropinas, entre las que se incluye la prolactina, el E_2 y la LH (Revisado en [50,51]). La elevada concentración de P_4 ejerce una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo durante la fase luteal, inhibiendo la liberación de GnRH y de gonadotropinas [52]. De este modo se mantiene un control sobre el desarrollo folicular, conservando una pequeña producción de estrógenos, mientras que se impide el pico preovulatorio de LH y los signos de celo, manteniéndose esta situación hasta que finalice el ciclo estral con la destrucción del CL [53].

En caso de no producirse la gestación, el cuerpo lúteo sufre una regresión o luteolisis mediada por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) fundamentalmente de origen uterino, aunque las células luteales tienen también capacidad para producirla [50]. Además de alterar la capacidad esteroidogénica de las células luteales, la $PGF_{2\alpha}$ influye sobre el aporte sanguíneo al CL [54]. Los cambios morfológicos que se suceden durante la luteolisis incluyen una degeneración de los capilares sanguíneos, el acúmulo de vacuolas lipídicas en las células luteales y un aumento del número de lisosomas [55]. La caída en la concentración de P_4 activará la producción de GnRH y de gonadotropinas necesaria para la maduración de un nuevo folículo ovulatorio y el inicio de un nuevo ciclo [52].

2. ACTIVIDAD UTERINA DURANTE EL CICLO ESTRAL

El útero consta de una pared en la que se distinguen tres capas concéntricas: la capa más externa o serosa se extiende sobre una gruesa estructura doble de músculo liso denominada miometrio. Sobre esta capa muscular se puede identificar la submucosa, compuesta de un estroma muy vascularizado, nervios, y glándulas tubulares, que junto al epitelio cilíndrico simple que la tapiza, constituye la capa más interna o endometrio [56]. En los rumiantes, el endometrio presenta discretas zonas aglandulares de protrusión denominadas carúnculas, que constituyen el punto de unión al embrión y de intercambio metabólico materno-fetal durante la gestación [21].

En la literatura se ha decidido dividir el útero ovino en los diferentes compartimentos celulares señalados a continuación: epitelio luminal caruncular (ELc) y no caruncular (ELnc), epitelio glandular superficial (EGs) y profundo (EGp), estroma caruncular (ESc), estroma superficial no caruncular (ESnc), estroma profundo (ESp) y miometrio (Mio) [57]. Los múltiples elementos involucrados en el control de la funcionalidad uterina, incluyendo las hormonas esteroideas liberadas por el ovario, ejercen una influencia espacio-temporal sobre los diferentes tipos celulares.

Papel de las hormonas esteroides ováricas sobre el útero

Las hormonas esteroides, estrógenos y progesterona, controlan múltiples aspectos de la vida reproductiva de los mamíferos, incluyendo el desarrollo sexual, la gametogénesis, la función gonadal, el comportamiento maternal o la gestación. Durante las diferentes fases del ciclo reproductivo, se suceden en el útero una serie de cambios morfológicos y bioquímicos regulados fundamentalmente por las hormonas esteroides ováricas, cuya actividad está mediada por la unión a su receptor. Los estrógenos foliculares inducen un aumento del tamaño del útero, gracias a una proliferación celular mediada por el receptor de estrógenos alfa (RE- α), estimulando también la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas endometriales [39]. Además, favorecen un mayor flujo sanguíneo al tracto reproductivo que asegura el aumento de la secreción mucosa y la llegada de leucocitos estimulada por la progesterona. Al final de la fase folicular, la coincidencia de altos niveles de estrógenos con una baja concentración de progesterona por destrucción del CL, induce la aparición de los signos de celo [47].

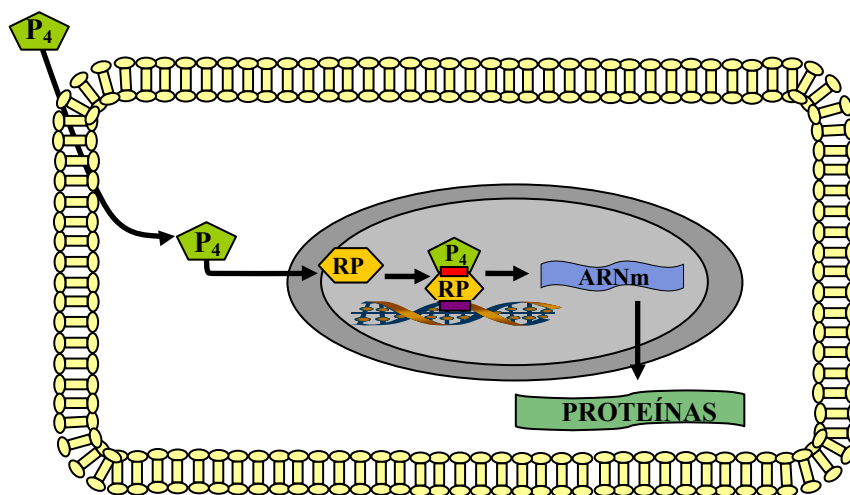
Por otro lado, la progesterona se encarga de preparar el tracto reproductivo para albergar un embrión en caso de que exista fecundación. Durante los primeros días de gestación, se estimula la secreción glandular y se provocan cambios en el patrón secretor de las células. En el oviducto y endometrio, se estimula la producción de proteínas esenciales para la viabilidad espermática y el correcto desarrollo del embrión [58-61]. Además de mantener la quiescencia del miometrio, impidiendo su contracción durante la fase luteal y la posible gestación, P₄ induce una marcada hiperplasia e hipertrofia de las glándulas uterinas, estimulando la síntesis del histotrofo, el cual está constituido por sustancias que contribuirán al desarrollo y crecimiento del embrión [62].

Básicamente, la actividad de estas hormonas está mediada por la unión a sus receptores, definidos como proteínas de localización nuclear constituidas por un dominio de unión a la hormona y un dominio de unión al ADN, sobre el cual ejercerán su efecto. La expresión endometrial de los receptores esteroides en las diferentes poblaciones

celulares cambia durante el ciclo estral y la gestación, modificando la sensibilidad celular a la acción de las hormonas circulantes [57,63-65].

Según el modelo clásico de acción esteroide, o modelo ligando-dependiente, la hormona atraviesa la membrana celular y llega hasta el núcleo donde se une a su receptor (representado en el **Esquema 2**). El complejo hormona-receptor sufre un cambio estructural y se activa, lo que permite su unión a elementos de respuesta a esteroides en genes diana, estimular la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y su posterior traducción en proteínas.

Existe otro modelo denominado ligando-independiente en el cual los receptores esteroides son activados intracelularmente por segundos mensajeros, sin necesidad de un ligando esteroide. La activación del receptor por moléculas como el adenosín monofosfato cíclico estimula la transcripción de genes diana sin presencia de las hormonas. Por otra parte, existe una actividad no genómica de las hormonas esteroides en la que se desencadenan cambios celulares al unirse a su receptor, sin que se active la transcripción génica [66].



Esquema 2. Representación del mecanismo clásico de acción de hormonas esteroides (progesterona/estrógenos). La hormona se une a su receptor en el núcleo, para influenciar la síntesis proteica en la célula. P₄, progesterona; RP, receptor de progesterona; ARNm, ARN mensajero.

Receptor de progesterona (RP)

La mayoría de las funciones fisiológicas de la progesterona están mediadas por dos isoformas de su receptor denominadas RP- α y RP- β [66,67]. Además, se ha propuesto otra vía de acción no-genómica mediada por un receptor RP de membrana (RPM- α) integrado en el grupo de receptores asociado a proteínas G [67].

Todos los tipos celulares del útero ovino expresan RP, con variaciones espacio-temporales en función de la concentración de hormonas esteroides circulantes y del estado reproductivo en el que se encuentre la hembra. En la oveja, Spencer y Bazer [57] localizaron el ARNm y la correspondiente proteína de RP durante el ciclo estral y la gestación temprana, demostrando que existen diferencias en los distintos tipos celulares uterinos. Entre los días 1-6 del ciclo, la abundante liberación de E₂ por el folículo ovulatorio y la creciente concentración de P₄ luteal estimulan la expresión de RP [65,68], con niveles máximos en el estroma y miometrio, y en menor cantidad en el epitelio luminal y glándulas superficiales. Posteriormente, la retroalimentación negativa de P₄ disminuye la expresión de RP en los compartimentos epiteliales [59], siendo solamente detectable en células del estroma y del miometrio durante los días 11-15 del ciclo y 11-25 de gestación. Esta peculiaridad en la expresión de su receptor asegura el mantenimiento de la sensibilidad uterina a la acción de la progesterona durante la gestación, ya que esta hormona desempeña un importante papel en la regulación inmune uterina [69], en el mantenimiento de la quiescencia miometrial y en la producción de diversos factores de crecimiento (progestamedinas) por las células del estroma durante este periodo [62,70,71].

Receptor de estrógenos (RE)

Existen dos tipos de receptor de estrógenos. El receptor de estrógenos alfa (RE- α , *ESR1*) es el predominante en el tracto reproductivo, mientras que el receptor de estrógenos beta (RE- β , *ESR2*) está presente fundamentalmente en el ovario [72,73].

El receptor alfa se detecta en todos los tipos celulares uterinos, observándose una mayor expresión en los días 1-3 del ciclo estral, coincidiendo con los picos plasmáticos de estradiol que se producen alrededor del estro [74,75]. Durante la fase luteal, P₄ se une a su receptor e inhibe la expresión endometrial de RE- α en lo que se conoce como el “bloqueo de la progesterona”. Por ello, la expresión del receptor de estrógenos disminuye en el epitelio luminal y glandular, así como en el miometrio, durante los días 1-6 del ciclo. En ovejas cíclicas, la inmunexpresión de RE- α aumenta en el epitelio y estroma endometrial alrededor de los días 13-15, coincidiendo con la regulación negativa sobre el receptor de progesterona [59]. En cambio, en ovejas gestantes no se detecta RE- α en el epitelio superficial (EL y EGs) a partir del día 11, aunque existe una baja expresión en el estroma y glándulas profundas [38,57,64].

Papel de la oxitocina y su receptor (ROT) sobre el útero

La oxitocina es un péptido implicado en numerosos procesos reproductivos de los mamíferos, entre los que se incluyen el inicio de la luteolisis o el comportamiento maternal. En el útero, además de inducir la liberación pulsátil de PGF_{2 α} , la oxitocina está considerada como uno de los agentes uterotónicos más potentes, responsabilizándola de las contracciones musculares que conducen al parto [76].

El receptor de oxitocina (ROT) es una proteína de superficie celular que pertenece a la familia tipo I de receptores acoplados a proteínas G y que consta de 7 dominios transmembrana [77,78], aunque se ha descrito también su expresión nuclear [79]. La activación de ROT por su ligando desencadena la activación de segundos mensajeros y variaciones en la concentración de iones provocando, entre otras acciones, la contracción de las células musculares del miometrio o la liberación de prostaglandinas por el endometrio [76]. Este receptor se localiza en todos los compartimentos del útero ovino, aunque su expresión durante el ciclo estral o la gestación depende de la concentración de oxitocina, de hormonas esteroides y de sus receptores [64]. Así, se ha observado que la administración de E₂ a ratas ovariectomizadas incrementa la expresión de ROT, efecto que no se observó con la adición de progesterona [80].

En el estro, los altos niveles de estradiol circulante estimulan una elevada expresión de ROT en el epitelio glandular superficial, el estroma caruncular y el miometrio [81]. Su expresión decrece en el día 1-2 al incrementarse la progesterona luteal, hasta ser indetectable entre los días 5-12 del ciclo [64]. Alrededor del día 14-16, ROT comienza a expresarse nuevamente en los compartimentos superficiales y profundos para mediar la actividad de la oxitocina, la cual se viene liberando de forma pulsátil por la hipófisis y el CL desde el día 9 [82,83], y se encarga de estimular la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ [84]. En caso de que exista gestación, se deprime la expresión de ROT a partir del día 14, lo que inhibe los pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e impide que se produzca la luteolisis. Si bien este mecanismo no se encuentra totalmente dilucidado, en ovino se ha demostrado que la disminución del ROT endometrial está precedida de una inhibición previa de $\text{RE-}\alpha$, provocada por la acción de una molécula de origen embrionario denominada interferón-tau [81,85,86].

Papel de la Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) en el útero

Desde los años 70 se ha asumido el papel de la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ como principal responsable de la destrucción del CL en ovejas cíclicas [87], sugiriéndose a posteriori que su producción estaba relacionada con las hormonas esteroides y la expresión uterina de sus receptores [88]. En la actualidad se sabe que el final del ciclo estral viene señalado por la luteolisis, cuyo inicio depende del comienzo de la liberación pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por el útero y del momento en que ésta aumente de frecuencia por acción de la oxitocina [89].

El endometrio de ovejas cíclicas y gestantes tiene una capacidad similar para producir $\text{PGF}_{2\alpha}$, la cual alcanza una concentración máxima alrededor del día 14-15 post-estro. En caso de que exista gestación, el patrón de liberación pre-luteolítica se modifica, inhibiéndose la pulsatilidad pero aumentando la secreción basal [54,84,90-92]. Si no existe embrión, la pérdida del bloqueo de la P_4 en los compartimentos superficiales uterinos permite el incremento en la expresión de $\text{RE-}\alpha$ alrededor del día 11-13, y de

ROT en el día 14. Esto se traduce en un aumento de la sensibilidad uterina a la oxitocina y la liberación del pulso luteolítico de $\text{PGF}_{2\alpha}$ [62,93].

Durante la fase luteal, la progesterona aumenta las reservas de fosfolípidos y la actividad enzimática necesaria para la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, sintetizada a partir del ácido araquidónico por la vía de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual se manifiesta en dos isoformas (COX-1 y COX-2). COX-2 es la isoforma más abundante en el endometrio ovino y se expresa tras ser inducida por diferentes factores [94]. Charpigny y colaboradores [95] observaron que la expresión de COX-1 no varía a lo largo del ciclo, mientras que COX-2 es detectable a partir del día 12 únicamente en el epitelio luminal y glándulas superficiales. Estudios posteriores han mostrado que la expresión de COX-2 aumenta en los días 10-12 del ciclo estral, disminuyendo en el día 16. Ésta expresión se mantiene en ovejas gestantes, por lo que se está estudiando su posible implicación reguladora en los procesos de implantación y desarrollo embrionarios [94,96].

3. GESTACIÓN

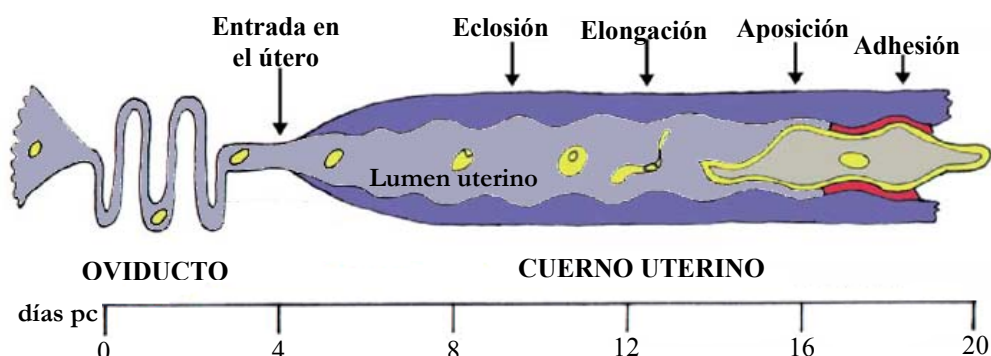
En caso de que haya existido fecundación, se ponen en marcha una serie de eventos fisiológicos coordinados entre la madre y el embrión, que tendrán como objetivo mantener la producción de P_4 durante un periodo de tiempo que supera la duración de la fase luteal normal.

Pre-implantación embrionaria

Una vez fecundado, el cigoto desciende por el oviducto y alcanza el útero alrededor del día 4 post coito (pc). Allí, experimenta una serie de cambios estructurales que le permiten adaptarse al ambiente materno (**Esquema 3**).

Alrededor del día 6pc se produce la evolución a blastocisto, constituido por una cavidad (blastocelo) rodeada por una monocapa celular (trofoectodermo). Posteriormente

(días 8-9pc), se rompe la zona pelúcida y el blastocisto eclosiona exponiendo la superficie del trofoblasto al medio uterino [97].



Esquema 3. Sucesión de eventos que tienen lugar durante la fase peri-implantacional temprana en la oveja. En el día 4pc, el embrión en estado de mórula entra en el útero. Eclosión del blastocisto durante los días 8-9pc. Alrededor del día 10-11pc se produce la elongación embrionaria y evolución a la forma filamentosa. Entre los días 12-15pc ocurre la aposición y unión lábil al epitelio luminal. Alrededor del día 15-16pc se inicia la unión firme al medio uterino. pc, días post-coito. Adaptado de Spencer y col., 2004.

En los rumiantes y en porcino, el blastocisto eclosionado comienza a alargarse en la denominada fase de elongación, cambiando de una forma esférica a una forma tubular/filamentosa alrededor del día 10-11pc. Durante esta fase de elongación se crean las membranas extraembrionarias, pasando a denominarse *conceptus* (embrión y sus envolturas) [21].

Aunque la eclosión de los blastocistos puede producirse *in vitro*, no ha sido posible reproducir la fase de elongación, por lo que se especula sobre la necesidad de que participen proteínas de origen endometrial en este proceso [71,98]. El desarrollo de un modelo ovino sin glándulas uterinas (oveja UGKO, del inglés *Uterine Gland Knock-Out*), ha permitido comprobar que los blastocistos de día 6-9pc en estos animales son normales, pero luego, en el día 14, los embriones muestran un crecimiento muy retardado, con incapacidad para elongar o incluso con pérdida de los mismos [99,100].

Una vez iniciada la fase de elongación, el trofoectodermo emite una señal que permitirá el reconocimiento de la gestación por parte del medio uterino, evitando que se desencadene el mecanismo luteolítico y que se inicie un nuevo ciclo estral [18].

Reconocimiento maternal de gestación

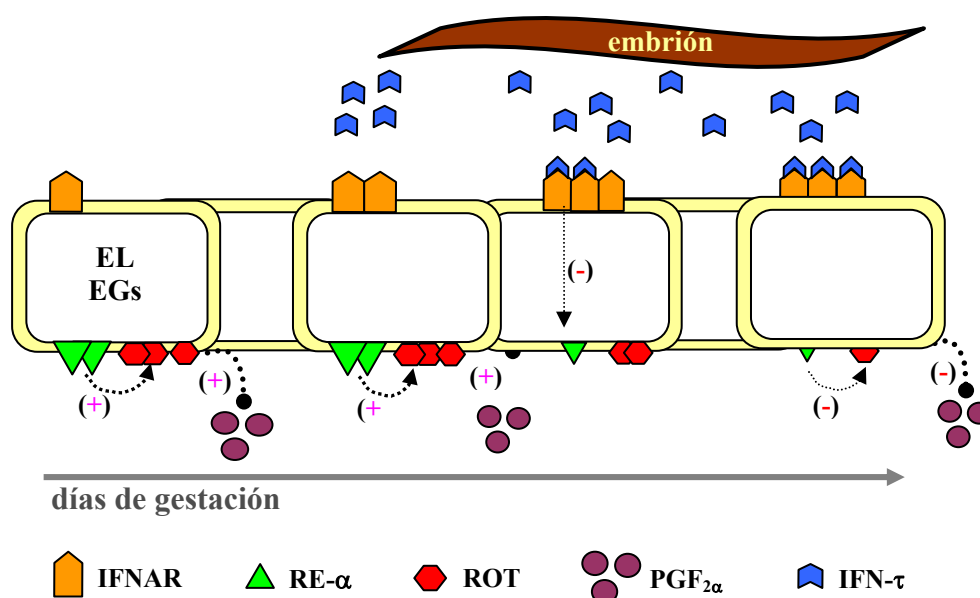
El reconocimiento de la gestación comprende el proceso fisiológico por el que el embrión indica su presencia al ambiente materno y prolonga la vida del CL, evitando una caída en la concentración de P_4 . En los rumiantes, la luteolisis se previene por acción de la molécula Interferón-tau (IFN- τ) [19], la cual es secretada por las células mononucleares del embrión y está considerada como la señal de reconocimiento maternal de gestación [101].

Inicialmente, IFN- τ fue descrito como proteína trofoblástica ovina [102,103], pasando luego a denominarse IFN- τ al demostrarse que poseía características similares a las de otras proteínas pertenecientes a la familia de interferones de tipo I [97,104,105].

Desde el estado de blastocisto se detectan niveles bajos del ARNm y de la proteína de IFN- τ , incrementándose su producción drásticamente alrededor del día 10 al iniciarse la fase de elongación del embrión y su orientación sobre la superficie endometrial [106]. Existen indicios de que el aumento en la producción de IFN- τ se correlaciona con el elevado nivel de P_4 maternal que existe durante esta fase temprana [107,108]. Tras alcanzar una concentración máxima en el día 14-16 de gestación, la expresión de IFN- τ disminuye de modo que deja de ser detectable a partir del día 25 [19].

Es sabido que la acción de IFN- τ está mediada por la unión a un receptor común (IFNAR) compuesto por dos subunidades (IFNAR1 e IFNAR2) que se expresan de manera constitutiva en todos los tipos celulares del endometrio cíclico y gestante, aunque su concentración se ve estimulada por la presencia de un embrión [109]. IFNAR muestra una abundante expresión durante los días 14-15 post-estro en el epitelio luminal y glandular superficial del endometrio ovino, lugares donde se produce la unión a IFN- τ

[110]. Además, al detectarse el receptor de interferón en embriones de días 15 y 16, se ha considerado la posibilidad de una actividad autocrina de IFN- τ como regulador de su propia secreción [111].



Esquema 4. Efecto antiluteolítico del embrión sobre el endometrio ovino. Tras la pérdida del bloqueo de la progesterona alrededor del día 8-10 post-estro, en ovejas cíclicas se estimula la expresión del receptor de estrógenos- α (RE- α) y del receptor de oxitocina (ROT) en epitelio luminal (EL) y glandular superficial (EGs). La oxitocina, mediada por ROT, induce la liberación pulsátil de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). En ovejas gestantes, el embrión en fase de elongación secreta Interferón-tau (IFN- τ) alrededor del día 10. IFN- τ se une a su receptor IFNAR, bloqueando la expresión de RE- α y ROT. La desaparición de ROT de EL y EGs impide la liberación pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ que destruiría el cuerpo lúteo.

El efecto antiluteolítico de esta molécula embrionaria se basa en inhibir la liberación pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ por parte del útero (representado en el **Esquema 4**). Para ello, IFN- τ actúa de forma paracrina sobre el endometrio, bloqueando la expresión de ROT como consecuencia de la inhibición previa de RE- α [81,85,86,97]. Al impedir el incremento de RE- α en el epitelio luminal y glándulas superficiales alrededor del día 13pc, IFN- τ inhibe indirectamente la expresión de ROT en estos compartimentos debido a que incluye elementos de respuesta a estrógenos en su gen [81]. La depresión sobre la

expresión de ROT interfiere con la liberación pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$, aunque sin alterar la producción basal de prostaglandinas [95,96,106].

Interferón-tau actúa de manera diferente en los distintos compartimentos uterinos (epitelio luminal, glandular y estroma), regulando la expresión de un gran número de genes denominados genes estimulados por interferón (ISGs), que son importantes en la diferenciación endometrial durante la fase peri-implantacional [71,112]. La mayor parte de ISGs son estimulados en el estroma y el epitelio glandular profundo [18], coincidiendo con los compartimentos donde se mantiene la respuesta a la progesterona al permanecer inalterada la expresión de RP [62,113]. Los ISGs regulan la síntesis de prostaglandinas y factores de crecimiento, e intervienen en cascadas de señalización celular, fenómenos de apoptosis y angiogénesis [114]. La falta de estímulo de estos genes en el epitelio luminal y glandular superficial parece estar relacionada con la expresión constitutiva en estos compartimentos del factor regulador de interferón-2, el cual aumenta durante la gestación temprana y actúa como un potente represor de la transcripción génica [115,116].

Implantación

En la oveja, la implantación consiste en la unión superficial (no invasiva) entre el trofoectodermo embrionario y el epitelio endometrial [71] mediante una secuencia de eventos que recibe el nombre de “cascada de la implantación” [21,22], denominada así por la similitud que guarda con la cascada de adhesión descrita para la extravasación de linfocitos en el ganglio linfático [117,118]. El proceso de implantación en la especie ovina se inicia el día 15-16 de gestación, no completándose hasta los días 50-60 [19].

La implantación se inicia con la fase de aposición (días 12-15pc), que consiste en la unión inestable del embrión al endometrio. El trofoectodermo desarrolla unas proyecciones citoplásmicas que forman interdigitaciones con el epitelio uterino e invaden los conductos superficiales de las glándulas [71]. Esta unión temprana del trofoectodermo al endometrio parece requerir la pérdida de componentes anti-adhesivos en las células del epitelio luminal y de las glándulas superficiales. En la oveja y en la cerda, la implantación

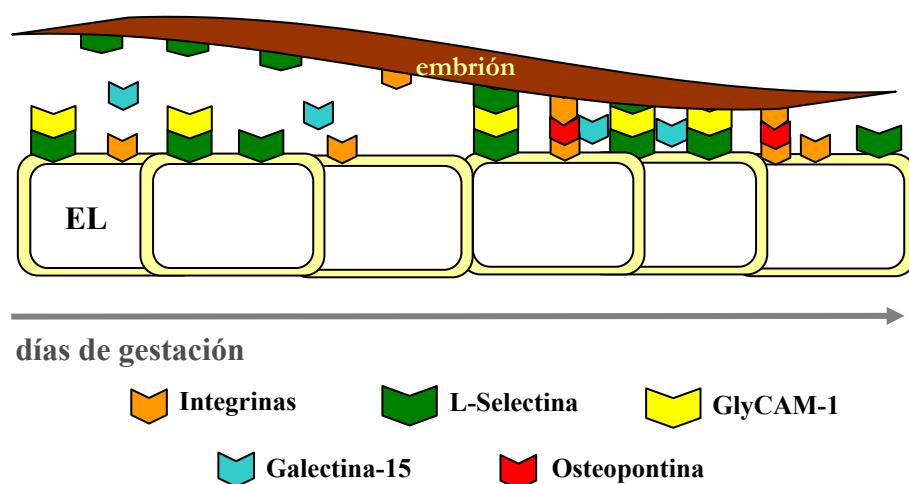
se inicia cuando disminuye la expresión de la glicoproteína mucina 1 a nivel del endometrio, coincidiendo con la desaparición del receptor de progesterona alrededor del día 11pc. Esta sustancia actúa como una barrera que impide la adhesión, y su pérdida permite la exposición de los receptores de diversos componentes, fundamentalmente integrinas y glicoproteínas implicadas en la adhesión entre el epitelio endometrial y el trofoblasto [21,24,62].

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que intervienen en la transducción de señales celulares reguladoras de los procesos de adhesión [119]. En estudios realizados en ratón y conejo, se ha demostrado que el bloqueo de la unión con las integrinas provoca una reducción en el número de puntos de implantación embrionaria [120,121]. A diferencia de otras especies, la expresión de las integrinas en el epitelio luminal y glandular de la oveja es constitutiva y no está influenciada por la existencia de una gestación [98,122], por lo que la receptividad del útero ovino a la implantación parece estar determinada por otras sustancias. Se ha implicado en este proceso a nuevas proteínas que actúan como moduladoras de la adhesión celular (**Esquema 5**), entre las que destaca la osteopontina, que ejerce de ligando de las integrinas, y la galectina-15 propia del endometrio ovino y caprino [21,23,24,60,62,98,112,123-127].

También como participe en el proceso de implantación, se ha involucrado a una pequeña familia de receptores de adhesión denominada selectinas, entre las que se incluye la L-Selectina [119,128]. En el ganglio linfático, L-Selectina reacciona con su ligando para inducir la activación de integrinas y su posterior unión a la fibronectina, permitiendo la extravasación de linfocitos tras su adhesión a las vénulas de endotelio alto [129-132]. Entre los ligandos de L-Selectina se encuentran la molécula GlyCAM-1 y la glicoproteína transmembrana CD34 [128,133-135]. Aunque GlyCAM-1 es reconocida por L-Selectina con mucha afinidad y con relativa especificidad, CD34 ha sido propuesto como un ligando mucho más importante para esta molécula [136].

Al igual que en la extravasación leucocitaria, los fenómenos de adhesión embrionaria podrían estar mediados por este sistema de las selectinas [117,118]. Se ha evidenciado la presencia de L-Selectina en el blastocisto [27] y un aumento de la

expresión de sus ligandos en el epitelio luminal y en las glándulas superficiales durante la ventana de la implantación [137,138] o en comparación con individuos infértiles [29]. Además, se ha sugerido un posible efecto regulador de la progesterona sobre la expresión de estos ligandos [138,139].



Esquema 5. Representación de las posibles interacciones entre el embrión y el epitelio luminal uterino (EL) que pueden participar en la adhesión durante la implantación. El GlyCAM-1 ejerce de ligando de la L-Selectina presente en el trofoblasto y en la superficie uterina. La osteopontina actúa como ligando de las integrinas. La molécula Galectina-15 es secretada por el endometrio y puede actuar como conector entre glicanos y proteínas y/o lípidos.

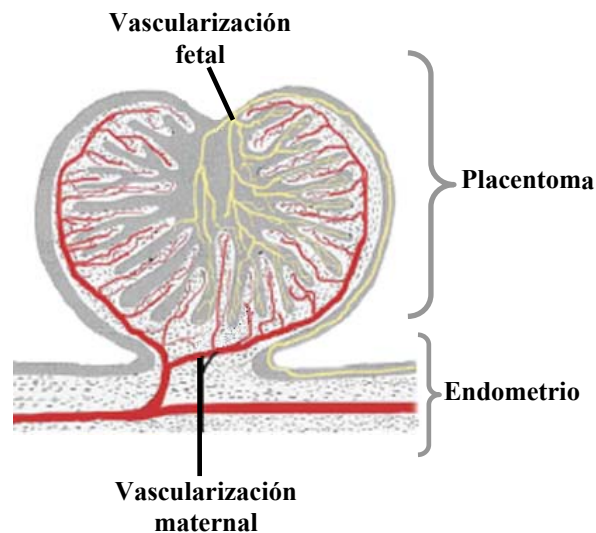
Sin embargo, el papel de esta selectina no ha sido aún aclarado, ya que estudios en humana han demostrado que el bloqueo en la expresión de L-Selectina inhibe [140], o altera [27], la adhesión materno-fetal, mientras que otros análisis llevados a cabo en ratones *knock-out* han descrito una aparente normalidad en los procesos de desarrollo embrionario, implantación y gestación [141]. En el útero ovino, se ha descrito la expresión de L-Selectina en células inmunes adyacentes a células endoteliales del endometrio durante el día 50 de gestación [28], aunque no se han encontrado datos de fases más tempranas. En cambio, su ligando GlyCAM-1 ha mostrado una diferente distribución espacio-temporal durante el ciclo estral y gestación temprana [26,100], demostrándose una mayor expresión en el epitelio luminal y glándulas superficiales de hembras preñadas durante los días 17 y 19pc. Este patrón de expresión endometrial, así como su detección en el trofoblasto, indican la participación de GlyCAM-1 en las uniones

materno-fetales durante la implantación ovina [26,28]. Sin embargo, no existen referencias bibliográficas acerca de la expresión de CD34 en las células del epitelio endometrial ovino.

Placentación

Como ya ha sido mencionado anteriormente, el endometrio ovino cuenta con zonas de estroma aglandular y tapizadas por epitelio luminal que se denominan carúnculas. Estas estructuras están implicadas en la unión a los cotiledones embrionarios, formando los placentomas (**Esquema 6**) donde tendrá lugar el intercambio metabólico materno-fetal durante la gestación [142].

Esquema 6. Representación de un placentoma ovino. La porción maternal está constituida por la carúncula endometrial (zona gris punteada), mientras que la porción fetal la conforman los cotiledones embrionarios (zona gris oscura). El soporte vascular de cada una de estas porciones del placentoma se representa en color rojo (vascularización maternal) o en color amarillo (vascularización fetal). Adaptado de Reynolds y col., 2005.



En la oveja, la implantación ocurre por unión firme del embrión al epitelio endometrial superficial alrededor del día 16pc (fase de adhesión), dando lugar a una placenta sinepiteliocorial no invasiva. En cambio, los carnívoros, roedores y primates tienen una implantación invasiva, ya que el blastocisto alcanza los vasos sanguíneos del estroma [90]. En la especie ovina, la unión al endometrio comienza cuando las células gigantes binucleadas del trofoblasto se fusionan con el epitelio luminal caruncular formando un sincitio de células trinucleadas. La fusión de estos sincitios crea unas placas que cubren la superficie de la carúncula colaborando en la formación de los placentomas [21,71,142].

Con el fin de asegurar las crecientes necesidades metabólicas del embrión tras su unión al endometrio, es necesario que exista un extenso proceso de angiogénesis y neovascularización para aumentar el flujo sanguíneo uterino y el intercambio entre la placenta materna y fetal [31,143,144]. En el útero grávido ovino, existe un aumento de la densidad microvascular en la carúncula y se desarrolla un plexo microvascular subepitelial en zonas carunculares e intercarunculares [145]. Además, se produce un incremento del flujo sanguíneo uterino que comienza entre los días 11-30 de la gestación y se mantiene a lo largo de la misma [146]. Es por ello que la efectividad de la placenta se correlaciona con su densidad vascular [147] y con su flujo sanguíneo [30,145,148-149], ya que una insuficiencia placentaria afectaría directamente al transporte de nutrientes al embrión, resultando en fallos de implantación, muerte embrionaria o alteración del crecimiento y desarrollo fetal [150-151].

El fenómeno de angiogénesis comprende la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular ya existente. En este proceso intervienen numerosos elementos, entre los que se incluyen diferentes factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular [152-153]. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es uno de los principales factores involucrados en la angiogénesis. Sus acciones fundamentales son aumentar la permeabilidad vascular, estimular la proliferación y migración de las células endoteliales para formar neovasos y mantener la estructura vascular [154-158]. Múltiples estudios implican a VEGF y sus receptores en los procesos de gestación temprana y placentación [154] de la mujer [159-160], de la ratona [161-163] o de la cerda [164-167]. En la especie ovina se observó un aumento de la expresión endometrial de los receptores de VEGF entre los días 14 y 30 de gestación [30], coincidiendo con los resultados descritos en vaca, en los que se detectó la inmunoexpresión de los componentes del sistema VEGF en los placentomas durante la fase peri-implantacional [168].

Por otro lado, la molécula PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell-Adhesion Molecule-1*, también conocida como CD31) colabora en la agregación y migración de las células endoteliales para formar neovasos, así como en la estabilización y el mantenimiento de la estructura vascular [152,169-171]. El papel de esta molécula en el

desarrollo vascular durante la placentación ha sido escasamente estudiado, destacando únicamente los trabajos de Rowe y colaboradores [172], quienes evalúan el desarrollo microvascular placentario en el tití común mediante el estudio de la expresión de CD31. Sin embargo, la relevancia de CD31 reside en que es expresado por los vasos recién formados [173-175] y por ello su detección inmunohistoquímica se utiliza habitualmente como un método de marcaje de neovascularización en condiciones fisiológicas o patológicas, fundamentalmente en tumores [169].

Junto con CD31, la expresión del Factor Von Willebrand (en inglés, vWF) ha sido también utilizada para identificar la vascularización en tejidos [145,174], aunque no permite identificar vasos inmaduros o células endoteliales individuales [176], por lo que su inmunodetección se considera menos eficaz para estudiar neoangiogénesis. Por otro lado, su estudio puede resultar de interés durante el periodo de formación de la placenta ya que un aumento en la expresión de vWF se ha asociado con el daño vascular, y con la maduración o la regresión de los vasos sanguíneos [177-180].

Al igual que sucede en otros procesos reproductivos, las hormonas sexuales (estrógenos y progesterona) intervienen en el proceso de neovascularización afectando a la expresión de un gran número de moléculas implicadas en la misma [181-185]. Por ello, numerosos autores han estudiado el posible impacto que los tratamientos de reproducción asistida pueden tener sobre la angiogénesis endometrial durante la gestación en la especie humana. Así, se ha observado que los protocolos anticonceptivos reducen la inmunoexpresión de VEGF en el epitelio glandular [186] del mismo modo que la densidad microvascular se reduce en mujeres sometidas a tratamientos de sustitución hormonal en la menopausia [187]. Jondet y colaboradores [188] demostraron que los tratamientos basados en progestágenos disminuían la densidad microvascular de una manera dosis-dependiente. Posteriormente se observó que estos tratamientos inhiben la expresión de VEGF mediada por el estradiol [189].

En la oveja, la literatura disponible acerca del impacto de los tratamientos de sincronización de celo sobre la expansión vascular del endometrio es muy limitada. Algunas referencias previas se centran principalmente en el estudio de la angiogénesis en

el cuerpo lúteo [15,190]. En la especie ovina se ha observado que las anomalías en el desarrollo vascular de la placenta conllevan a alteraciones en la implantación [191], mortalidad embrionaria [150], problemas en el desarrollo fetal [151,192,193], pérdidas de gestación [194] y compromiso de la supervivencia o crecimiento postnatal [195,196].

4. PÉRDIDAS EMBRIONARIAS

En los animales de producción, las pérdidas reproductivas tienen un importante impacto económico. La mayor parte de estas pérdidas tienen lugar durante el periodo embrionario, incluyendo desde el momento de la fertilización hasta la diferenciación [197]. En los rumiantes domésticos el periodo más crítico ocurre durante la fase de implantación, alrededor de la tercera semana de gestación [101,112,150,198].

Se han barajado diversas causas como responsables de esta gran mortalidad, incluyendo los factores maternos [197] y destacando la influencia e impacto de una asincronía materno-fetal [198-200]. La descoordinación entre el grado de crecimiento embrionario y el estado fisiológico materno ha sido relacionada con cambios en la concentración de las hormonas esteroides ováricas, principalmente la progesterona [201-205]. En ovino y vacuno se ha comprobado que niveles adecuados de progesterona plasmática en la fase post-ovulatoria se relacionan positivamente con la supervivencia embrionaria, mientras que niveles muy altos conducen al efecto contrario [107,204,206-208]. Por otra parte, en ovejas con menor P_4 plasmática en esta fase se produce un crecimiento retardado del embrión y una menor secreción de $IFN\tau$ [108,202]. Cuando se administran suplementos de progesterona durante la fase luteal temprana, se observa un incremento en los niveles de P_4 post-ovulatoria que se asocia a una mayor tasa de gestación [208] y un mayor desarrollo embrionario [201,209-210], aunque en otros estudios no se encontraron diferencias [211]. Estas discrepancias pueden estar motivadas por la existencia de otros factores que colaboran en generar una asincronía materno-fetal además de las variaciones en la progesterona post-ovulatoria, como pueden ser la fertilidad materna, la raza, el estado metabólico o posibles defectos genéticos [112].

5. TRATAMIENTOS DE SINCRONIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL

Las técnicas de reproducción asistida constituyen una herramienta básica en la industria agropecuaria ya que permiten la optimización de costes, una mejora de la eficiencia reproductiva y la concentración de parideras. Entre estas técnicas se incluyen los protocolos de inseminación artificial, los tratamientos hormonales de control del ciclo estral y/o momento de ovulación, la transferencia de embriones o los tratamientos de superovulación [212]. Los tratamientos hormonales son utilizados rutinariamente en la especie ovina para conseguir la sincronización del estro [1]. Se emplean dos tipos de tratamientos, los que se basan en alargar la fase luteal por medio de progesterona y sus derivados, y aquellos encaminados a producir la inducción prematura de la luteolisis utilizando $\text{PGF}_{2\alpha}$ y sus análogos [5,213].

Protocolos basados en progestágenos

Estos tratamientos son los utilizados con mayor frecuencia en ovino, ya que presentan la ventaja de que pueden usarse tanto en la época reproductiva como en la fase de anestro [214-215]. En la actualidad, la forma de administración más frecuente es mediante esponjas intravaginales impregnadas en progesterona, acetato de flugestona o acetato de medroxiprogesterona, que son mantenidas alrededor de 12-14 días [4]. Además, también existe la posibilidad de una administración oral o en forma de implantes subcutáneos [216-218].

El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la LH, que interrumpe la cascada endocrina responsable de la maduración de los folículos y, por lo tanto, la ovulación. La retirada del progestágeno permite que se reinicie la actividad ovárica, continuando con la maduración folicular, la manifestación de signos de celo y la ovulación en 2-8 días. Para incrementar la eficacia de estos tratamientos, se ha empleado la utilización conjunta con el efecto macho [219-220] y con otros suplementos hormonales, como pueden ser la gonadotropina de suero de

yegua gestante (PMSG) o la FSH, aplicados previamente o a continuación de los 12-14 días que se mantiene el dispositivo con el progestágeno [8,221-223].

Uno de los principales problemas que plantea el uso de estas sustancias es que el empleo de tratamientos hormonales en las especies domésticas está sometido a un control constante por parte de las administraciones. A nivel europeo se ha reglamentado la utilización de sustancias activas con efecto sobre el aparato reproductor en las especies domésticas, estableciéndose para muchas de ellas un Límite Máximo de Residuos (LMR) en los productos de origen animal (Reglamento UE nº 37/2010 de la Comisión-22 de Diciembre 2009, Unión Europea), ya que su aplicación puede suponer un peligro potencial para el consumidor [224].

Por otro lado, cuando se comparan con el ciclo natural, se ha observado que estos tratamientos producen baja fertilidad y altas pérdidas embrionarias [197,225]. Se considera que los protocolos basados en progestágenos tienen una eficiencia variable según el tipo de dispositivo utilizado [6] o el momento del ciclo en el que se inserte [7], así como problemas derivados de la pérdida de los dispositivos intravaginales, vaginitis, retención de la esponja, días de mantenimiento del dispositivo [226] o la no asimilación del contenido total del compuesto [8]. También se ha especulado con la posibilidad de que produzcan alteraciones en el patrón de liberación de la LH o en la calidad de las ovulaciones [35,225,227]. Se ha demostrado que los progestágenos tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de los oocitos cuyo crecimiento ha sido estimulado con gonadotropinas exógenas como la FSH [228]. La baja fertilidad obtenida en el primer servicio se atribuyó a la ovulación de folículos procedentes de varias ondas de crecimiento [229], aunque posteriormente se ha demostrado que estos folículos son igualmente fértiles en ovino [230]. También se sugirió que la menor eficacia de la sincronización con progestágenos era debida a anomalías en el transporte y supervivencia del espermatozoide en el tracto femenino [231], aunque luego se ha comprobado que existe una motilidad cervical periovulatoria similar a la del celo natural [232].

Protocolos basados en prostaglandinas

La utilización de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y sus análogos surge como una alternativa al tratamiento convencional de progestágenos, ya que actúan induciendo una luteolisis prematura con características endocrinas muy similares a las del celo natural [3,233]. La forma de aplicación es mediante dos inyecciones intramusculares (i.m.) separadas por 9-11 días, ya que se ha comprobado que el cuerpo lúteo no es sensible a la prostaglandina antes del día 5 del ciclo [10], por lo que una segunda inyección terminaría con un posible CL que no iniciara luteolisis con la primera [4,11].

Una de las principales ventajas de este tratamiento es que las prostaglandinas no generan productos residuales al ser rápidamente metabolizadas por vía pulmonar, de modo que no existe un control estricto de utilización y no se exige un LMR para estos compuestos, ya que no depositan residuos en las canales. Esto supone una gran ventaja ante el creciente interés en crear una industria más ecológica [9]. Otro beneficio de utilizar este protocolo es la fácil aplicación del producto mediante inyección intramuscular, lo que permite eliminar la problemática relacionada con las esponjas intravaginales.

Sin embargo, los protocolos basados en prostaglandinas y sus análogos conllevan el inconveniente de que tienen un coste muy elevado, además de que sólo pueden utilizarse durante la estación reproductiva, al ser necesaria la presencia previa de un cuerpo lúteo [4,5]. Por otro lado, su eficiencia dependerá del momento del ciclo en el que se aplica la inyección, ya que como se ha mencionado previamente, la sensibilidad del cuerpo lúteo a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ difiere según los días del ciclo [10-13].

Al igual que ocurre con los progestágenos, se ha comprobado que la sincronización con estos protocolos da lugar a una menor eficiencia reproductiva cuando se compara con el ciclo natural, demostrando menores tasas de concepción, prolificidad y fecundidad [234,235]. Aunque dos inyecciones i.m. de $\text{PGF}_{2\alpha}$ permiten sincronizar al 80% de las ovejas, la fertilidad obtenida es bastante menor de lo esperado [236]. Estos

bajos resultados se han relacionado con alteraciones en la dinámica folicular pre-ovulatoria [237], menor concentración de P_4 durante esta fase, inconsistencias en el tiempo que transcurre hasta la ovulación y anormalidades en el desarrollo luteal [234,237-238]. Fierro y colaboradores [234] indican que la utilización de prostaglandinas no altera la calidad de los embriones en el día 7pc, aunque luego se produce una alta tasa de pérdidas durante la gestación a pesar de que las concentraciones de P_4 en los animales tratados eran similares a las del ciclo natural entre los días 12 y 17 pc.

Situación actual en cuanto a la utilización de ambos protocolos

Debido a la necesidad de encontrar en ovino un tratamiento de sincronización que permita obtener mayores beneficios y mejores resultados, se han llevado a cabo numerosos estudios para comparar la eficacia de protocolos basados en progestágenos o en análogos de prostaglandinas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha son muy variados y contradictorios. En la literatura disponible, la mayoría de trabajos en los que se demuestran diferencias están centrados en la fase post-ovulatoria del ciclo y la gestación temprana pre-implantacional.

Cuando se comparó la función hipofisaria y ovárica en animales tratados con ambos protocolos frente a la de animales control, se observó que los progestágenos mostraban mayores diferencias con el ciclo natural, producto de una alteración en la calidad de los folículos preovulatorios y del cuerpo lúteo. Por ello, se consideró a los análogos de prostaglandinas como una mejor alternativa [14]. Sin embargo, en otros trabajos se observó que las tasas de fertilidad y fecundidad obtenidas tras la sincronización con $PGF_{2\alpha}$ e inseminación artificial eran considerablemente menores en comparación con los progestágenos [239], mientras que en estudios similares la fertilización no se vio afectada [2].

En otro estudio, se indicó que la inmovilidad y muerte espermática aumentaban de forma similar al utilizar un tratamiento u otro, debida a una alteración sobre la motilidad del tracto genital [240]. Por otro lado, en ovejas cíclicas sincronizadas con

PGF_{2α} se demostró una menor concentración plasmática de progesterona hasta el día 10 post-estro [241]. En cambio, en otros trabajos se observó una mayor producción post-ovulatoria de P₄ entre los días 0-21 de gestación en este mismo grupo [16].

Cuando se valoró el efecto de estos tratamientos en la gestación temprana ovina, la expresión de RE-α y RP en el tracto reproductor en los días 4 y 7 de gestación fue mayor al sincronizar con prostaglandinas [17]. Lo mismo ocurrió con la concentración plasmática de E₂, a pesar de que el diámetro folicular era mayor en los animales que recibieron progestágenos [2]. Por otro lado, se han observado tasas de recuperación embrionaria similares entre ambos tratamientos [2,234], a pesar de que previamente se mostraran diferencias [242]. Del mismo modo, se observó que la calidad de los oocitos/embriones recuperados era similar [243], aunque posteriormente se demostró una tendencia a obtener una mejor calidad embrionaria tras la sincronización con prostaglandinas [2].

Debido a esta controversia, aún no se ha llegado a una conclusión definitiva sobre el protocolo de sincronización de celo que mejor se adaptaría a la fisiología reproductiva en la especie ovina.

Material y Métodos

1. MANEJO REPRODUCTIVO DE LOS ANIMALES

En este estudio se han utilizado 64 ovejas adultas multíparas (3-8 años de edad) de raza Manchega, con adecuada condición corporal y alimentación basada en una dieta de mantenimiento y agua *ad libitum*. Los animales fueron estabulados en la granja experimental del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en Madrid (España) latitud 40°25'N. Estas instalaciones cumplen con los requisitos establecidos en el protocolo desarrollado para procedimientos científicos de la Unión Europea. El experimento se ha realizado dentro del intervalo considerado como estación reproductiva para la oveja Manchega en esta latitud, englobando desde Octubre hasta Marzo.

Los animales se distribuyeron al azar en dos grupos diferentes:

Grupo P: constituido por 24 ovejas cuyo celo se sincronizó mediante la inserción de una esponja intravaginal impregnada con progestágenos, concretamente con 40mg de acetato de fluorogestona (FGA, Chronogest®, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands), que se mantuvo durante 14 días.

Grupo PG: formado por 25 ovejas cuyo celo fue inducido mediante la administración de dos inyecciones intramusculares de cloprostenol (Estrumate®, Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Germany) de 100 µg cada una, con un intervalo de separación de 10 días.

2. VALORACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA DE CELO

La detección de los signos de celo se llevó a cabo cada 6 horas, durante las 18-42 horas siguientes a la retirada de la esponja intravaginal (Grupo P) o a la aplicación de la segunda inyección (Grupo PG), mediante el empleo de moruecos adultos en proporción 1:1. El número de ovejas que respondieron al tratamiento de sincronización de celo fue similar en ambos grupos [72.4% en el grupo P (n=24) y 81.2% en el grupo PG (n=25)]. Se permitió la monta en aquellas hembras en las que se detectó el celo, repitiéndose a las

6-12 horas con el fin de asegurar la fecundación. Los animales que no mostraron signos de celo tras las primeras 42h se excluyeron del estudio.

Para evitar el uso inadecuado de hembras que no hubiesen ovulado, se valoró diariamente la presencia de al menos un cuerpo lúteo en cada oveja mediante ecografía transrectal (7.5 MHz, Aloka SSD-500, Ecotron, Madrid, Spain). La tasa de fecundación en el rebaño se mantuvo en el 92% de las ovejas sometidas a cualquiera de los dos tratamientos de sincronización utilizados en el estudio.

3. ANÁLISIS DE LA PROGESTERONA PLASMÁTICA

En los animales de ambos grupos se llevó a cabo la determinación de la progesterona plasmática desde el inicio del celo (día 0) hasta el día 21 de gestación, para lo cual se tomaron muestras de sangre yugular diariamente.

Para la extracción de sangre se utilizaron tubos de vacío heparinizados (Vacutainer Systems Europe; Becton Dickinson, Meylan, France). Las muestras se centrifugaron a 1500 revoluciones durante 15 minutos y el plasma que se obtuvo se almacenó a -20°C hasta el momento de su valoración en el laboratorio. La concentración de progesterona se midió utilizando un kit de radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count Progesterone; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). La sensibilidad para la progesterona fue de 0.09 ng/ml y los coeficientes de variación inter- e intra-análisis fueron 5.1% y 4.2% respectivamente.

4. TOMA DE MUESTRAS Y PROCESADO

Tras el sacrificio de los animales con una sobredosis de T 61® (Hoescht-Roussel Vet. A.I.E.), se extrajo el tracto reproductivo para su observación macroscópica. Se tomaron muestras de ambos cuernos uterinos de cada animal en los días 9 (grupo P, n=4; grupo PG, n=5), 13 (P, n=5, PG, n=5), 15 (P, n=5, PG, n=5), 17 (P, n=5, PG, n=5) y 21 (P, n=5, PG, n=5) de gestación.

Procesado de las muestras

Las muestras se sometieron a un proceso de fijación siguiendo el siguiente protocolo:

- Día 1: inclusión en paraformaldehído al 4%.
- Día 2: lavado en PBS.
- Día 3: inclusión en etanol de 30° (todas las diluciones de los alcoholes se prepararon con etanol de 100° diluido en agua desionizada tipo milli-Q).
- Día 4: inclusión en etanol de 50°.
- Día 5: inclusión en etanol de 70°.

Los tejidos se mantuvieron en los líquidos mencionados durante 24 horas a una temperatura de 4°C.

Una vez fijadas, las muestras se procesaron de forma rutinaria para su estudio histológico. Tras el tallado, las muestras se colocan en casetes de inclusión de rejilla con tapa (TESPA®, Giessen, Alemania), para su inclusión en parafina sintética (Histo-Comp, Casa Alvarez, Madrid, España) utilizando un procesador de tejidos de vacío automatizado (Leica ASP 300), mediante un programa que incluye los siguientes pasos:

- Alcohol 70°: 45 minutos
- Alcohol 80° 45 minutos
- Alcohol 96°: 2 x 45 minutos
- Alcohol 100°: 2 x 60 minutos
- Histo-Clear® (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA): 2 x 45 minutos
- Histo-Clear®: 60 minutos
- Parafina: 180 minutos
- Parafina: 180 minutos

Una vez finalizado el proceso de inclusión, se procede a la realización manual de los bloques en una unidad formadora de bloques Leica EG1140H, y estos se depositan en una placa fría (Leica EG1130) para la solidificación de los mismos. A partir de estos bloques se obtuvieron secciones de tejido de 4µm de grosor, mediante un microtomo de rotación motorizado modelo Leica RM2255, que se tiñeron para realizar el estudio histológico e inmunohistoquímico.

	Desenmascaramiento Antigénico	Suero Normal	Ac. Primario	Ac. Secundario	Estreptavidina
RP	Olla Tampón Citrato pH=6	No	1:40, Durante la Noche 4°C	1:400 ⁽²⁾ , 1 hora, TªAmb.	45 min.
IFNAR	Microondas 750W EDTA pH=8 3 x 5 min	1:20 ⁽¹⁾ , 20 min, TªAmb.	1:50, Durante la Noche 4°C	1:200 ⁽³⁾ , 30 min, TªAmb.	45 min.
RE-α	Olla Tampón Citrato pH=6	No	1:10, Durante la Noche 4°C	1:400 ⁽²⁾ , 1 hora, TªAmb.	45 min.
ROT	Olla Tampón Citrato pH=6	1:20 ⁽¹⁾ , 20 min, TªAmb.	1:100, Durante la Noche 4°C	1:200 ⁽³⁾ , 30 min, TªAmb.	45 min.
CD34	Microondas 750W EDTA pH=8 3 x 5 min	1:20 ⁽¹⁾ , 30 min, TªAmb.	1:100, Durante la Noche 4°C	1:200 ⁽³⁾ , 1 hora, TªAmb.	45 min.
VEG F	Olla Tampón Citrato pH=6	No	1:25, Durante la Noche 4°C	1:400 ⁽²⁾ , 30 min, TªAmb.	30 min.
vWF	Tripsina 37°C, 10 min + Microondas 750W Tampón Citrato pH=6, 5min	1:20 ⁽¹⁾ , 30 min, TªAmb.	1:2000, Durante la Noche 4°C	1:200 ⁽³⁾ , 30 min, TªAmb.	45 min.

Ac, anticuerpo, Tª Amb., temperatura ambiente;

⁽¹⁾ Suero Normal de Cerdo Code N°X0901 (Dako A/S, Denmark).

⁽²⁾ Suero anti-IgG de ratón obtenido en caballo (Vector Laboratories Ltd., Burlingame, CA, USA).

⁽³⁾ Suero anti-IgG de conejo obtenido en cerdo Code N°E0353 (Dako A/S, Denmark).

Tabla 1 . Particularidades respecto de la técnica general descrita para el análisis inmunohistoquímico mediante estreptavidina-biotina-peroxidasa.

Para el estudio inmunohistoquímico del receptor de progesterona (RP), receptor de Interferón de tipo I (IFNAR1), receptor de estrógenos alfa (RE- α), receptor de oxitocina (ROT), CD34, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor von Willebrand (vWF), se utilizó la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Las particularidades para cada uno de los anticuerpos se exponen a continuación (**Tabla 1**).

Técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina-peroxidasa convencional

- 1) Desparafinar e hidratar: se desparafina en xilol (10 minutos) y se rehidrata mediante pases (5-10 minutos) por una serie de alcoholes de concentración decreciente (100°, 96°, 70°). Posteriormente se lava en agua destilada (5 minutos).
- 2) Desenmascaramiento antigénico: puede realizarse de varias formas según el anticuerpo utilizado.
 - I. Tratamiento por calor en olla a presión, con 2 litros de solución tampón citrato (10 mM, pH=6). Cuando alcanza la presión máxima, se baja la temperatura y se esperan 2 minutos. Posteriormente, se retira la olla de la fuente de calor y se esperan 10 minutos antes de abrirla. Se dejan enfriar las preparaciones durante 30 minutos dentro del tampón citrato.
 - II. Tratamiento por calor en microondas a 750 W, con 250 ml de tampón EDTA (1 mM, pH=8). Se someten las preparaciones a 3 ciclos consecutivos de 5 minutos cada uno, rellenando con EDTA en caso de que éste no cubra las preparaciones a causa de la evaporación. Se dejan enfriar las preparaciones durante 30 minutos dentro del tampón EDTA.
 - III. Tratamiento enzimático con tripsina al 0.01% (Sigma®) durante 10 minutos en estufa a 37°C.
- 3) Lavado I: las preparaciones se lavan 2 veces en agua destilada, en pases de 5 minutos cada uno.

- 4) Inhibición de la actividad de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergen en una solución de H_2O_2 (1,5ml) en metanol (100ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente (T^a Amb.).
- 5) Lavado II: se hacen dos pases en agua destilada y dos pases en TBS Tween (tampón trifosfato salino + 0.5ml/L Tween®).
- 6) Bloqueo de uniones inespecíficas: se utiliza un suero normal en caso de que el anticuerpo primario sea policlonal. Se incuba a T^a Amb durante 20 minutos.
- 7) Anticuerpo primario: tras retirar el suero normal en el caso de anticuerpos policlonales, o tras el lavado en el caso de los monoclonales, se añade el anticuerpo primario y se deja incubar toda la noche a $4^{\circ}C$, o 1 hora a T^a Amb., según corresponda. Los anticuerpos primarios utilizados para el desarrollo de este trabajo son los siguientes:
 - Anticuerpo monoclonal anti-RP obtenido en ratón (clon α PR6, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) diluido 1:40 en TBS.
 - Anticuerpo policlonal anti-IFNAR obtenido en conejo (IFN α/β R α -R100 sc-845 Santa Cruz Biotechnology, Inc; Santa Cruz, CA, USA) diluido 1:50 en TBS.
 - Anticuerpo monoclonal anti-ER- α obtenido en ratón (clon C-311, Santa Cruz Biotechnology, Inc; Santa Cruz, CA, USA) diluido a 1:10 en TBS.
 - Anticuerpo policlonal anti-ROT obtenido en conejo (AB9241, Chemicon International, Inc; Temecula, CA, USA) diluido 1:100 en TBS.
 - Anticuerpo policlonal anti-CD34 obtenido en conejo (ab64480, Abcam plc, Cambridge, UK) diluido 1:100 en TBS.

- Anticuerpo monoclonal anti-VEGF obtenido en ratón (VEGF (C-1) sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido 1:25 en TBS.
 - Anticuerpo policlonal anti-Factor von Willebrand obtenido en conejo (Code No A0082, Lot 105, DAKO A/S, Denmark) diluido 1:2000 en TBS.
- 8) Lavado III: se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno en TBS Tween.
- 9) Anticuerpo secundario: incubación con un anticuerpo biotinilado a temperatura ambiente durante 30 minutos, de características específicas en función del anticuerpo primario utilizado. Este suero secundario se utiliza diluido en TBS a la concentración correspondiente.
- 10) Lavado IV: dos lavados de 5 minutos con TBS tveen.
- 11) Conjugado con estreptavidina: se añade un preparado de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed, Cat. N°43-4323, Madrid, Spain) diluida 1:400 en TBS e incubando a T^aAmb. 30 ó 45 minutos según el Ac. utilizado.
- 12) Revelado: se incuba a T^a ambiente con una solución cromógena que contiene 3,3'-tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (DAB kit, K4100, Vector Laboratories Ltd., Burlingame, CA, USA) en agua destilada, durante el tiempo necesario para visualizar la reacción de color (3-10 minutos).
- 13) Lavado V: se lavan las preparaciones en agua corriente durante 5 minutos.
- 14) Contraste con hematoxilina: se sumergen las preparaciones en hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

- 15) Lavado VI: las preparaciones se lavan en agua corriente durante 10 minutos.
- 16) Deshidratación y montaje: se deshidratan las muestras realizando pases rápidos (30 segundos-1 minuto cada uno) por una serie de alcoholes de concentración creciente (70°, 96°, 100°) y se aclaran en xilol. Por último, se montan con medio de montaje anhidro DPX (Surgipath®, Leica Microsystems, UK) y se coloca un cubreobjetos sobre la preparación.

En todos los casos se incluyó un control negativo de la técnica, sustituyéndose el anticuerpo primario por un anticuerpo IgG-no inmune obtenido en conejo o en ratón (Dakocytomation Cat. No.Z0259; BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) dependiendo de la especie en la que se hubiese obtenido el anticuerpo secundario. El control positivo utilizado fue un control interno (útero). En el caso de CD34 se utilizó tonsila humana.

Técnica in munohistoquímica mediante otros sistemas de d etección dife rentes a la estreptavidina-biotina peroxidasa

Para estudiar la inmunolocalización de las proteínas CD62L (L-Selectina) y CD31 (PECAM-1) se utilizaron diferentes kits de detección inmunohistoquímica. El protocolo empleado fue el descrito por las casas comerciales para los respectivos preparados utilizados. Las particularidades de cada anticuerpo se especifican esquemáticamente a continuación (**Tabla 2**).

- 1) Desparafrinar e hidratar: igual que en la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa.
- 2) Desenmascaramiento antigénico: para los anticuerpos sometidos a este protocolo se utilizó como fuente de calor el microondas a 750 W, y 250 ml de EDTA (1 mM, pH=8) como tampón.
- 3) Lavado I: lavado en dos pases de agua destilada, 5 minutos cada uno.

- 4) Bloqueo de la peroxidasa: se incubaba con la solución *Peroxidase Block* correspondiente para cada kit durante 5 minutos a T^aAmb.
- 5) Lavado II: dos lavados de 5 minutos en TBS Tween.
- 6) Bloqueo de actividad inespecífica (sólo cuando se utiliza el *Novolink Polymer Detection System*). se incuban las preparaciones con la solución *Protein Block* durante 5 minutos a T^aAmb. A continuación se realizan dos lavados de 5 min. en TBS Tween.

	Desenmascaramiento Antigénico	Bloqueo de la Peroxidasa	Suero Normal	Ac. Primario	Ac. Secundario	Estreptavidina
CD62L	Microondas 750W EDTA pH=8 3 x 5 min	Kit ARK ⁽¹⁾ 5 min, T ^a Amb.	No	1:50, 2 horas T ^a Amb.	No	<i>Streptavidin</i> ARK ⁽¹⁾ 1 hora T ^a Amb.
CD31	Microondas 750W EDTA pH=8 3 x 5 min	<i>Peroxidase Block</i> ⁽²⁾ 5 min, T ^a Amb.	<i>Protein Block</i> ⁽²⁾ 5min, T ^a Amb	1:300, 1 hora T ^a Amb.	<i>Post primary block</i> ⁽²⁾ , 30 min, T ^a Amb.	<i>Novolink Polymer</i> ⁽²⁾ 30 min, T ^a Amb.

Ac, anticuerpo, T^a Amb., temperatura ambiente;

⁽¹⁾ DakoCytomation ARKTM (Animal Research Kit), Peroxidase for Mouse Primary Antibodies, Code K3954 15mL (Dako A/S, Denmark).

⁽²⁾ Novolink Polymer Detection System, N°RE7140-K (Leica Microsystems, United Kingdom).

Tabla 2. Particularidades de cada anticuerpo cuyo análisis inmunohistoquímico ha sido realizado siguiendo un protocolo específico para kit comercial.

- 7) Anticuerpo primario:

- Anticuerpo monoclonal anti-extremo carboxiterminal de CD62L obtenido en ratón (Clon 9H6, ab49508, Abcam plc, Cambridge, UK) diluido 1:50 según se describe en el protocolo del kit ARKTM.

- Anticuerpo policlonal anti-CD31 obtenido en conejo (Ca N°250590. Abbotec, LLC, San Diego, CA.) diluido 1:300 en una solución creada con 25% Novolink *Protein Block* + 75% TBS a fin de prevenir uniones inespecíficas.
- 8) Lavado IV: dos lavados de 5 minutos en TBS Tween.
- 9) En el caso del *Novolink Polymer Detection System*, las preparaciones se incuban con *Post Primary Block* durante 30 minutos. A continuación, se hacen dos lavados en TBS tween, seguidos de una incubación con *Novolink Polymer* durante 30 minutos. Cuando usamos el ARKTM de Dako, las muestras se incubaron con la estreptavidina-peroxidasa proporcionada en dicho *kit* durante 30 minutos a T^a Amb. En ambos casos, tras la incubación se hicieron dos lavados de 5 minutos en TBS Tween, agitando suavemente.
- 10) Revelado con DAB: incubación durante 5 minutos con un preparado de DAB incluido en el kit, siguiendo las especificaciones de cada casa comercial.
- 11) Lavado VII: 5 minutos en agua corriente.
- 12) Contraste con hematoxilina, deshidratación y montaje: de manera idéntica a la realizada en la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa.

En ambos casos se incluyó un control negativo, sustituyéndose el anticuerpo primario por un anticuerpo IgG-no inmune obtenido en ratón o en conejo (Dakocytomation Cat. No.Z0259; BD Diagnostics, Sparks, MD, USA). En el caso del anticuerpo anti-CD62L se utilizó tonsila humana como control positivo, mientras que para el anti-CD31 se utilizó el propio útero (control interno).

Valoración de la inmunotinción

Para la valoración de los resultados de RP, IFNAR, RE- α , ROT, CD62L y CD34, se llevó a cabo un análisis subjetivo cuyo fin fue evaluar la expresión de dichas proteínas en los diferentes compartimentos celulares del útero. En el caso de VEGF, CD31 y vWF, la expresión se estudió en las estructuras vasculares de la carúncula. Los análisis fueron realizados por dos observadores independientes mediante un estudio ciego.

El estudio de estas moléculas en las diferentes muestras fue llevado a cabo en función de los objetivos marcados en esta tesis, de modo que la expresión de RP, IFNAR, RE- α y ROT fue analizada en los días 9pc, 13pc, 15pc, 17pc y 21pc. Por otro lado, el estudio de la expresión de CD62L y CD34, así como la inmuoexpresión vascular de VEGF, CD31 y vWF, se llevó a cabo durante los días 15pc, 17pc y 21pc.

Los compartimentos uterinos estudiados fueron divididos en dos grandes regiones (**Figura 1**): zona caruncular [epitelio luminal caruncular (ELc) y estroma caruncular (ESc)] y zona no caruncular, la cual fue a su vez organizada en función de un área superficial [epitelio luminal no caruncular (ELnc), estroma no caruncular (ESnc), epitelio glandular superficial (EGs)] y un área profunda [estroma profundo (ESp), epitelio glandular profundo (EGp), y miometrio (Mio)] [57].

Para la evaluación de la inmuoexpresión de RP, IFNAR, RE- α , ROT, CD62L y CD34, se examinaron al menos 5 campos de cada compartimento con el objetivo 40x. A cada estrato celular se le asignó una puntuación media en función de la intensidad de tinción observada (0=negativa, 1=intensidad débil, 2=intensidad moderada, 3=intensidad fuerte). En el caso de RP, RE- α y ROT la tinción fue nuclear, mientras que en el caso de IFNAR, CD62L y CD34 la expresión fue citoplasmática.

Con el fin de valorar la inmuoexpresión vascular de VEGF, CD31 y vWF, se utilizó el programa de análisis de imágenes Image J®. En cada muestra analizada se examinaron 6 campos de estroma caruncular con el objetivo de 40x, contando las estructuras vasculares (capilares y arteriolas) inmunomarcadas con los anticuerpos

utilizados frente a las proteínas citadas. A cada animal se le asignó un número medio de estructuras positivas por mm^2 , tras el conteo realizado en ambos cuernos uterinos. El área incluida en cada campo fue 0.019671 mm^2 . Los parámetros estudiados fueron: densidad vascular total (número total de estructuras vasculares/ mm^2), densidad capilar total (número total de capilares/ mm^2) y densidad arteriolar total (número total de arteriolas/ mm^2).

Las imágenes han sido obtenidas a través de una cámara Olympus DP50 conectada a un microscopio Olympus Bx50 y procesadas en un ordenador mediante la utilización de los programas Viewfinder Lite® y StudioLite ® (Better Light Inc, San Carlos, CA) compatibles con Windows XP.

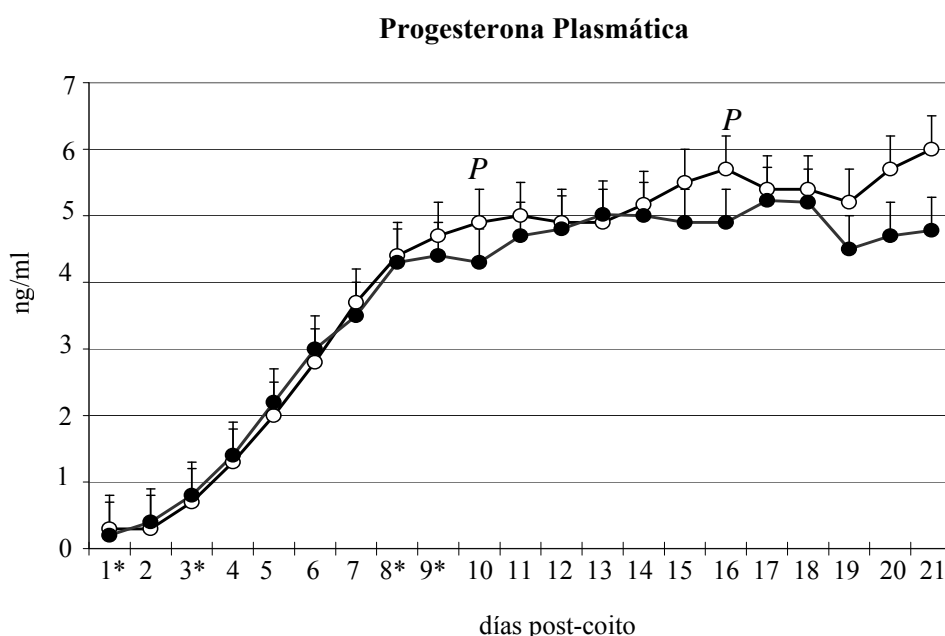
5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados en el Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid mediante el programa SPSS Statistics 19 Software para Windows (SPSS-Ibérica Inc., España). Los niveles de progesterona plasmática fueron analizados mediante la prueba t de Student. La expresión media de RP, IFNAR, RE- α , ROT, CD62L y CD34 en los diferentes compartimentos uterinos se estudió mediante un análisis de varianza (ANOVA) multivariable, con el fin de determinar el efecto del tratamiento, del día post coito, y la interacción entre ambos. Este mismo análisis se llevó a cabo para comparar las densidades medias de VEGF, CD31 y vWF. También se incluyó el análisis de la correlación de Pearson entre diferentes factores del estudio. En caso de que se observaran diferencias significativas derivadas del efecto del día post coito, se realizó una prueba *post hoc* de Duncan. Todos los resultados están expresados en forma de media \pm error estándar de la media (e.e.m.), considerándose estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$. Valores de P comprendidos entre 0.05 y 0.1 se consideraron como tendencia.

Resultados

1. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE PROGESTERONA DURANTE LA FASE POST-OVULATORIA Y GESTACIÓN TEMPRANAS.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la progesterona plasmática han sido ilustrados en la **Gráfica 1**. El nivel de P_4 en plasma fue mayor en el grupo tratado con análogos de prostaglandinas, demostrando diferencias en los días 10pc y 16pc ($P<0.05$) de nuestro estudio. Aunque no se obtuvo significación estadística en el resto de los días, se observó que la concentración de progesterona plasmática fue ligeramente mayor en el grupo P durante la primera parte del análisis. Sin embargo, a partir del día 7pc los niveles fueron superiores en el grupo PG, a excepción del día 13pc.



Gráfica 1. Concentración de progesterona plasmática desde el día 1pc al día 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (○) y con progestágenos (●). (P) indica diferencias significativas entre tratamientos; (*) muestra diferencias estadísticamente significativas entre días post-coito. Resultados expresados como media±error estándar.

Además, la concentración de P_4 en el plasma evolucionó de manera diferente en función del día de análisis, aumentando progresivamente en ambos grupos experimentales durante la primera mitad de nuestro estudio, de modo que existieron diferencias

significativas entre los días 1pc ($P<0.05$), 3pc ($P<0.05$), 8pc ($P<0.01$) y 9pc ($P<0.001$). A partir de aquí y hasta el día 21pc, el nivel de progesterona plasmática evoluciona de una forma menos drástica y sin mostrar significación estadística.

2. EXPRESIÓN UTERINA DE RECEPTORES DE PROGESTERONA, DE ESTRÓGENO-ALFA, DE INTERFERÓN TIPO I Y DE OXITOCINA DURANTE LA FASE DE RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA GESTACIÓN.

Expresión uterina de RP

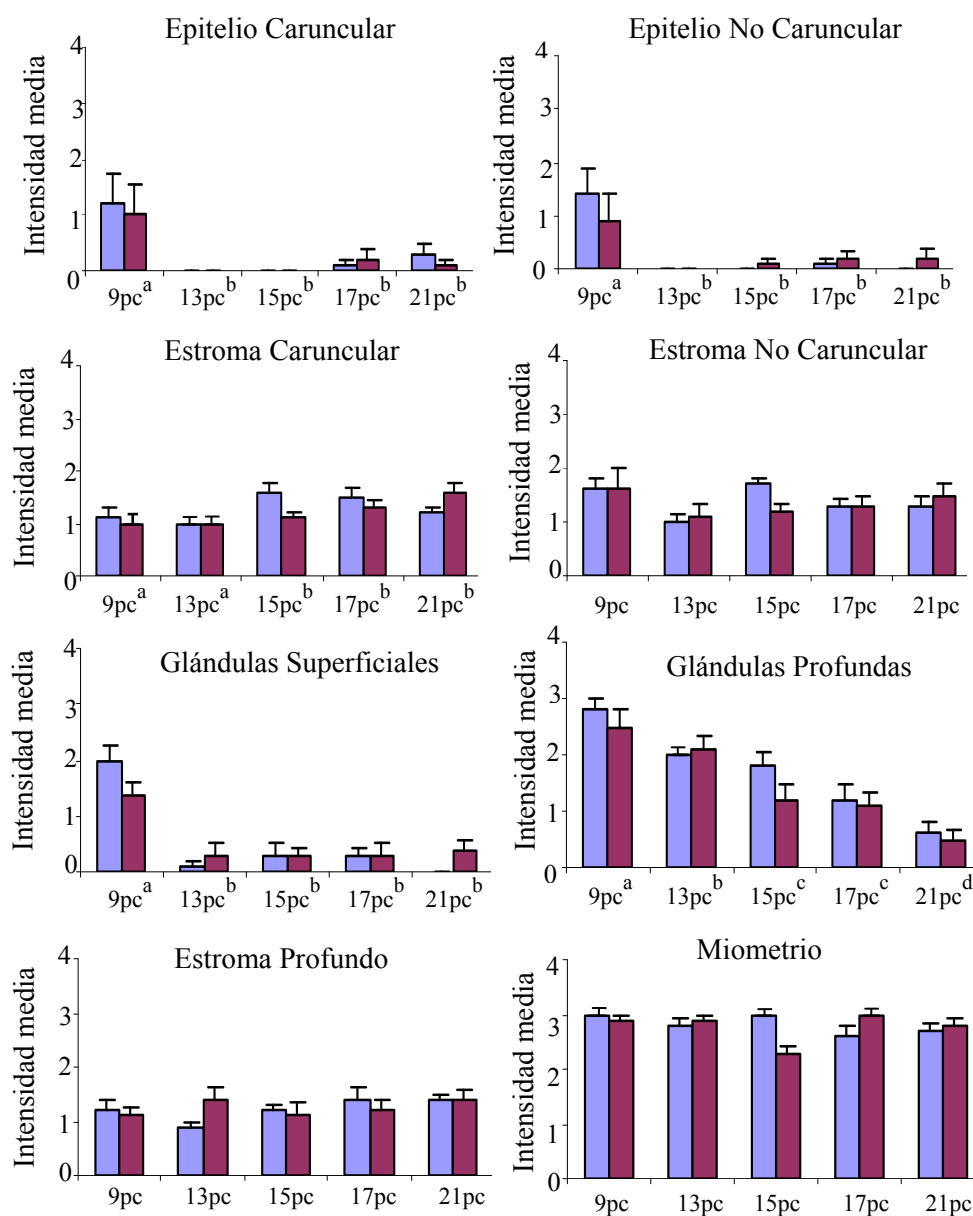
Observamos positividad nuclear para RP en todos los compartimentos celulares uterinos analizados, mostrando diferente intensidad de tinción en función de la mayor o menor expresión de este receptor. Los resultados de la expresión de RP en los distintos compartimentos uterinos quedan reflejados en la **Gráfica 2**, así como en la **Figura 2a** y **2b**.

Al comparar la expresión de este receptor en los dos grupos experimentales, se demostró interacción estadística día x tratamiento únicamente en el estroma caruncular ($P=0.027$) y en el miometrio ($P=0.000$). En el resto de compartimentos estudiados no se encontraron diferencias significativas, ya que el patrón observado fue similar.

Por otra parte, la expresión de RP demostró un patrón decreciente desde el día 9 a 21pc en la mayoría de los compartimentos uterinos estudiados ($P<0.01$), con excepción del estroma no caruncular, estroma profundo y miometrio, donde se mantuvo constante en ambos grupos experimentales hasta el día 21pc. En el estroma caruncular, RP aumentó entre los días 9 a 21pc ($P<0.01$), demostrando un patrón diferente entre ambos tratamientos. En el grupo tratado con progestágenos existió un incremento progresivo, mientras que en el grupo PG aumentó hasta el día 15pc y disminuyó posteriormente entre los días 17 y 21pc. La prueba *post hoc* de Duncan permitió definir las diferencias entre días para cada compartimento celular, que fueron las siguientes: epitelio luminal caruncular y no caruncular (9pc^a, 13-21pc^b), estroma caruncular (9-13pc^a, 15-21pc^b),

epitelio glandular superficial (9pc^a, 13-21pc^b) y epitelio glandular profundo (9pc^a, 13pc^b, 15-17pc^c, 21pc^d).

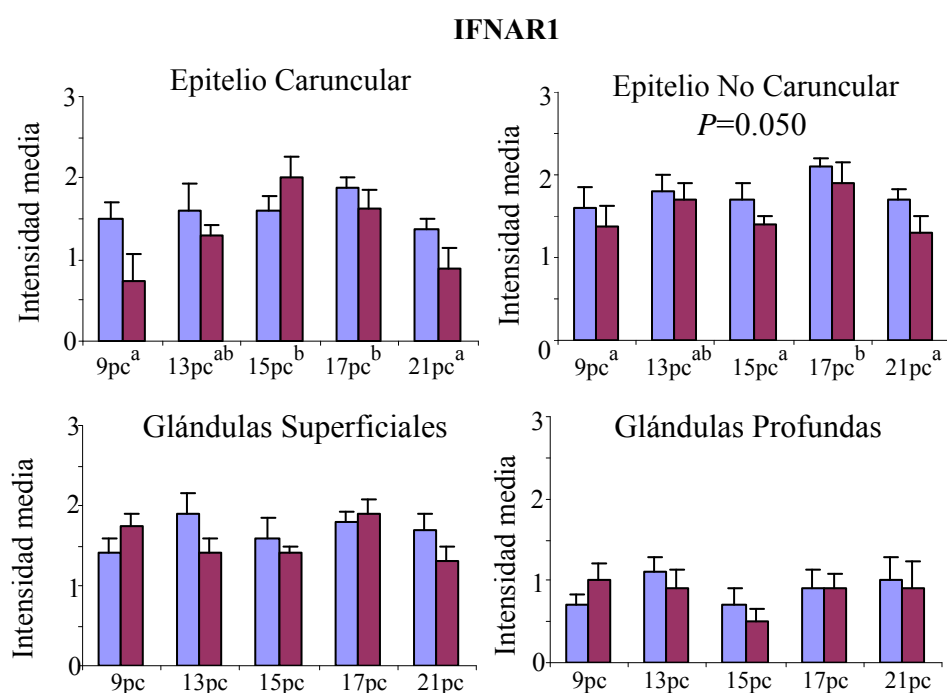
Receptor de Progesterona



Gráfica 2. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de RP en los diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc, 13pc, 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). (^{abcd}) indica diferencias significativas entre los días post-coito. Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

Expresión uterina de IFNAR1

Se observó positividad citoplásmica de IFNAR1 en las células de los compartimentos epiteliales estudiados, mostrando diferentes grados de intensidad de tinción en función de la mayor o menor expresión de este receptor. Los resultados de la expresión de IFNAR1 en los distintos compartimentos uterinos evaluados se muestran en la **Gráfica 3** y se ilustran en la **Figura 3a y 3b**.



Gráfica 3. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de IFNAR1 en los diferentes compartimentos epiteliales uterinos durante los días 9pc, 13pc, 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). (abc) indica diferencias significativas entre días post-coito. Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

El patrón de expresión de IFNAR1 fue similar en ambos grupos experimentales, aunque se pudieron observar diferencias que presentaron una tendencia estadística en las células del epitelio no caruncular ($P=0.050$) y caruncular ($P=0.075$). Además, es evidente

la mayor expresión de IFNAR1 en los compartimentos superficiales de ambos grupos de tratamiento con respecto a la observada en el epitelio glandular profundo.

Al comparar la expresión del receptor a lo largo del estudio, la presencia de IFNAR1 demostró variaciones significativas en el epitelio luminal ($P<0.05$) que no fueron observadas en el compartimento glandular. La prueba de Duncan señaló la relación estadística entre los días analizados en el epitelio caruncular (9pc^a, 13pc^{ab}, 15-17pc^b, 21pc^a) y no caruncular (9pc^a, 13pc^{ab}, 15pc^a, 17pc^b, 21pc^a).

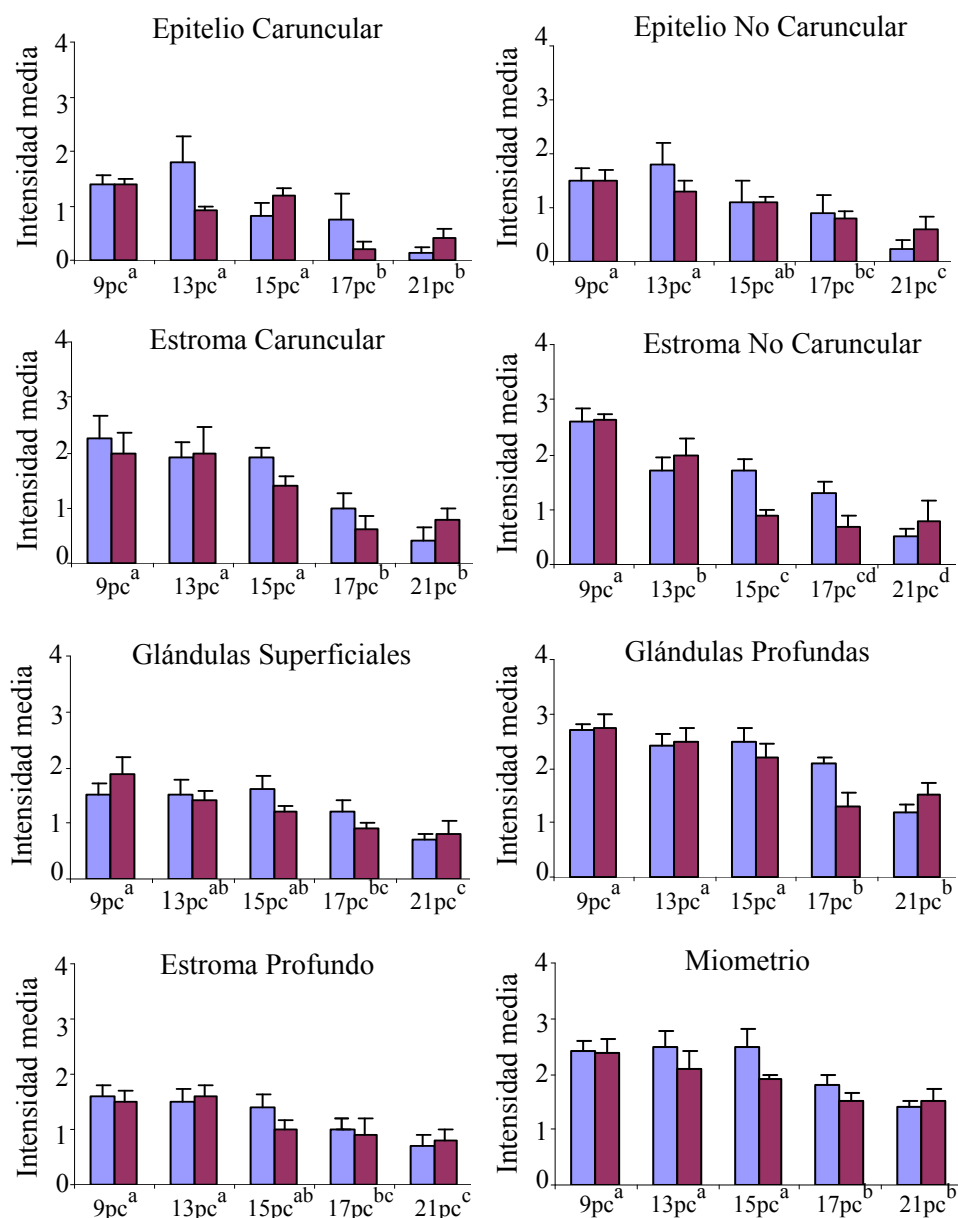
Expresión uterina de RE- α

El receptor de estrógenos alfa mostró positividad nuclear en las células de todos los compartimentos uterinos que fueron estudiados, observándose una tinción de diferente intensidad según la mayor o menor expresión del receptor. Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de RE- α en los compartimentos uterinos han sido representados en la **Gráfica 4**, así como en la **Figura 4a y 4b**.

Ambos grupos experimentales expresaron RE- α de manera similar, observándose interacción día x tratamiento únicamente en el estroma no caruncular ($P=0.05$).

La presencia del receptor de estrógenos alfa fue diferente en función del día de estudio, observándose un descenso en su expresión desde el día 9 al 21pc en todos los compartimentos uterinos evaluados ($P<0.01$). El análisis *post hoc* de Duncan puso de manifiesto las diferencias entre días que se detallan a continuación: epitelio y estroma caruncular (9-15pc^a, 17-21pc^b), epitelio no caruncular (9-13pc^a, 15pc^{ab}, 17pc^{bc}, 21pc^c), estroma no caruncular (9pc^a, 13pc^b, 15pc^c, 17pc^{cd}, 21pc^d), epitelio glandular superficial (9pc^a, 13-15pc^{ab}, 17pc^{bc}, 21pc^c), células de las glándulas profundas (9-15pc^a, 17-21pc^b), estroma profundo (9-13pc^a, 15pc^{ab}, 17pc^{bc}, 21pc^c) y miometrio (9-15pc^a, 17-21pc^b).

Receptor de Estrógenos- α



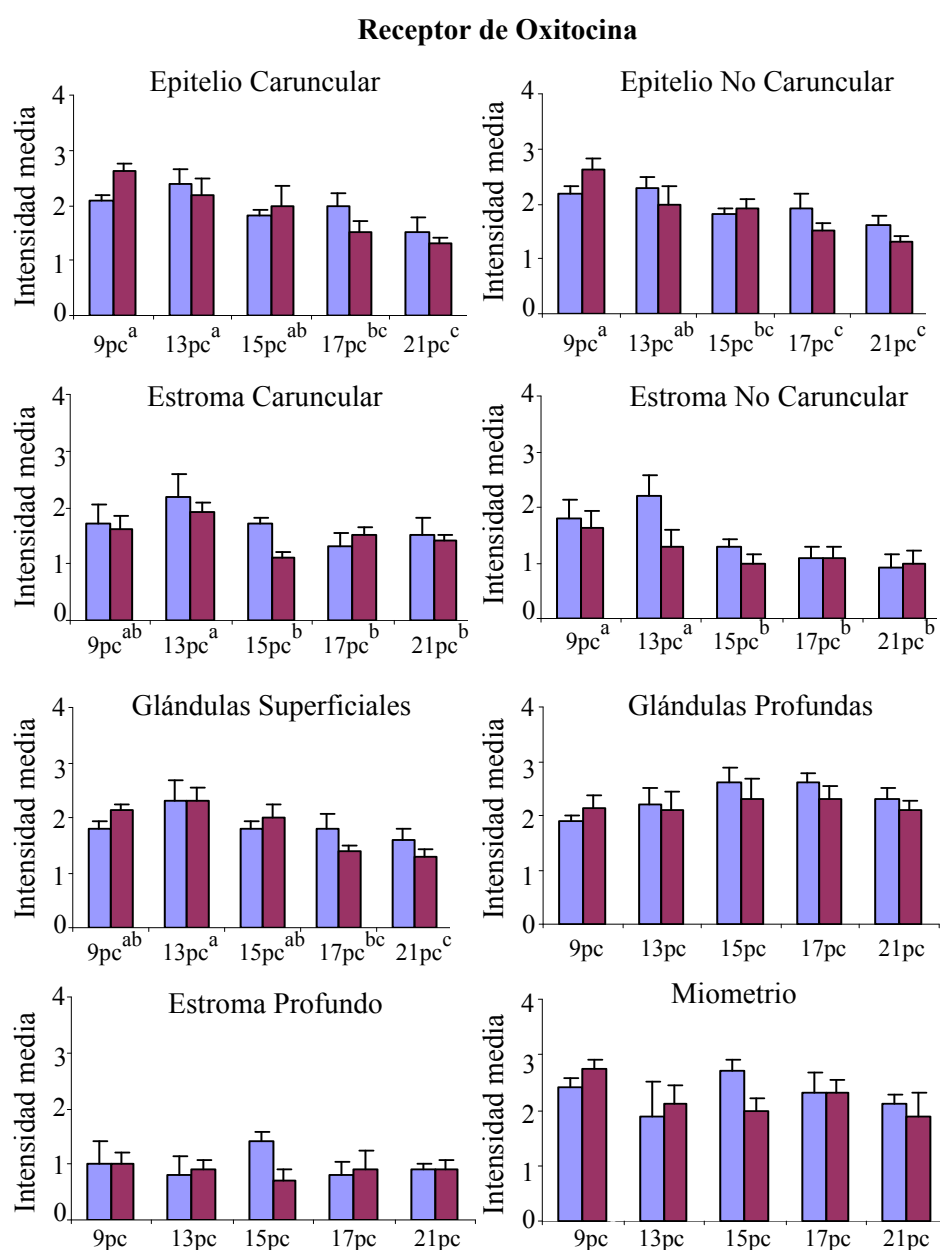
Gráfica 4. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de RE- α en los diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc, 13pc, 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). (abcd) indica diferencias significativas entre los días post-coito. Los resultados han sido expresados en media \pm error estándar.

Expresión uterina de ROT

El receptor de oxitocina mostró positividad nuclear en todos los compartimentos celulares uterinos estudiados, observándose una diferente intensidad según la mayor o menor expresión del receptor. Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de ROT en los distintos compartimentos uterinos se han representado en la **Gráfica 5** y se ilustran en la **Figura 5a y 5b**.

Ambos grupos de tratamiento mostraron una expresión de ROT similar en todos los compartimentos, por lo que no se demostraron diferencias estadísticamente significativas. De manera general se observó una mayor positividad de ROT en los compartimentos uterinos del grupo PG.

Al comparar los días de gestación, la expresión del receptor de oxitocina reveló diferencias significativas en los compartimentos superficiales ($P<0.05$). En cambio, en el estrato profundo, la inmunorreacción observada fue más constante. El análisis *post hoc* de Duncan permitió establecer diferencias en la presencia de ROT para cada compartimento analizado, demostrándose una evolución significativa: epitelio caruncular (9-13pc^a, 15pc^{ab}, 17pc^{bc}, 21pc^c) y no caruncular (9pc^a, 13pc^{ab}, 15pc^{bc}, 17-21pc^c); estroma caruncular (9pc^{ab}, 13pc^a, 15-21pc^b) y no caruncular (9-13pc^a, 15-21pc^b), y epitelio glandular superficial (9pc^{ab}, 13pc^a, 15pc^{ab}, 17pc^{bc}, 21pc^c).



Gráfica 5. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de ROT en los diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc, 13pc, 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). (^{abcd}) indica diferencias significativas entre los días post-coito. Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

Correlación existente entre la expresión uterina de RP, IFNAR, RE- α y ROT

A continuación se detallan las correlaciones obtenidas entre RP, IFNAR, RE- α y ROT en los días 9 a 21pc, dentro de los diferentes compartimentos uterinos estudiados en las ovejas de celo sincronizado con análogos de prostaglandinas (**Tabla A**) o con progestágenos (**Tabla B**).

Compartimento	Variables correlacionadas	Correlación de Pearson	Significancia
Epitelio Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.653$	$P=0.001$
Estroma Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.510$	$P=0.011$
Epitelio No Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.573$	$P=0.003$
Estroma No Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.471$	$P=0.018$
Glándulas Profundas	RP-RE- α	$r^2 = 0.707$	$P=0.000$
Estroma Profundo	RE- α -ROT	$r^2 = 0.401$	$P=0.047$
Miometrio	RE- α -ROT	$r^2 = 0.391$	$P=0.054$
Miometrio	RE- α -RP	$r^2 = 0.347$	$P=0.089$

Tabla A. Correlaciones significativas ($P \leq 0.05$) o con tendencia obtenidas en el grupo PG.

Compartimento	Variables correlacionadas	Correlación de Pearson	Significancia
Epitelio Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.413$	$P=0.045$
Estroma Caruncular	RP- RE- α	$r^2 = -0.460$	$P=0.024$
Epitelio No Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.672$	$P=0.000$
Estroma No Caruncular	RE- α -ROT	$r^2 = 0.402$	$P=0.051$
Glándulas Superficiales	RP-RE- α	$r^2 = 0.394$	$P=0.057$
Glándulas Superficiales	RE- α -ROT	$r^2 = 0.640$	$P=0.001$
Glándulas Profundas	RP-RE- α	$r^2 = 0.577$	$P=0.003$
Estroma Profundo	RP-RE- α	$r^2 = 0.522$	$P=0.009$
Estroma Profundo	RP-ROT	$r^2 = 0.416$	$P=0.043$
Estroma Profundo	RE- α -ROT	$r^2 = 0.415$	$P=0.044$
Miometrio	RE- α -ROT	$r^2 = 0.364$	$P=0.081$

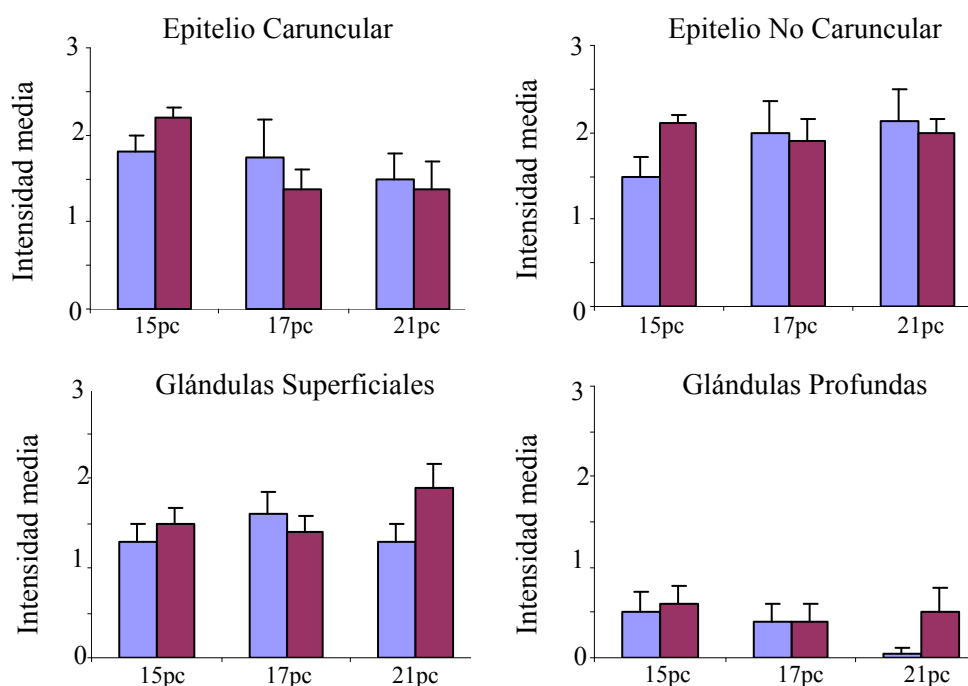
Tabla B. Correlaciones significativas ($P \leq 0.05$) o con tendencia obtenidas en el grupo P.

3. EXPRESIÓN DE L-SELECTINA (CD62L) Y SU LIGANDO CD34 EN LOS COMPARTIMENTOS EPITELIALES UTERINOS DURANTE EL PERIODO DE ADHESIÓN E IMPLANTACIÓN TEMPRANA.

Expresión de L-Selectina

Observamos positividad citoplásmica para CD62L en las células epiteliales de los compartimentos estudiados, mostrando diferente intensidad en función de la mayor o menor presencia de este receptor en las células. Los resultados de la expresión de CD62L en los distintos compartimentos uterinos evaluados se muestran en la **Gráfica 6**, así como en la **Figura 6a y 6b**.

L-Selectina



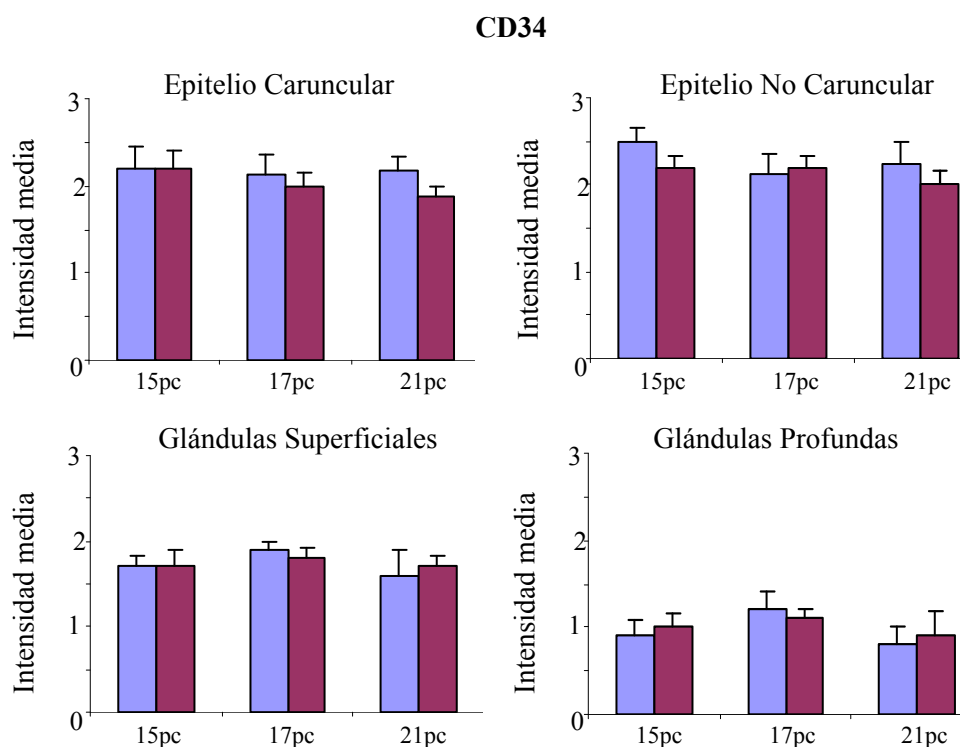
Gráfica 6. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de L-Selectina en los diferentes compartimentos epiteliales uterinos durante los días 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

Durante esta fase del estudio (días 15 a 21pc), en ambos grupos experimentales la expresión de L-Selectina fue similar en el epitelio luminal y glandular uterino, de modo

que no se obtuvieron diferencias significativas al comparar tratamientos o días de gestación. Aunque esta observación no fue respaldada por una significación estadística, en el grupo P se observó una mayor presencia de CD62L en el día 15pc en todos los compartimentos analizados. Por otro lado, L-Selectina mostró una abundante expresión en los compartimentos superficiales (epitelio caruncular, no caruncular y glándulas superficiales) en comparación con el estrato glandular profundo.

Expresión de CD34

El ligando CD34 se expresó en el citoplasma de las células epiteliales positivas, observándose tinción en todos los compartimentos estudiados. Existió una intensidad diferente en función de la mayor o menor presencia del ligando en las células. Los resultados obtenidos en cuanto a su expresión en los distintos compartimentos se han ilustrado en la **Gráfica 7** y se representan en la **Figura 7a y 7b**.



Gráfica 7. Expresión media de la proteína inmunorreactiva de CD34 en los diferentes compartimentos epiteliales uterinos durante los días 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

CD34 siguió un patrón similar en ambos grupos de animales a lo largo de los días estudiados, por lo que no se han demostrado diferencias significativas al comparar tratamientos o días de gestación. La positividad celular frente a este ligando se mantuvo prácticamente constante entre los días 15pc y 21pc. Además, CD34 se expresó en niveles muy elevados en el epitelio luminal, lo que junto con la abundante inmunorreacción observada en las glándulas superficiales, permitió evidenciar una clara predominancia sobre el estrato glandular profundo.

4. EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR, CD31 Y FACTOR VON WILLEBRAND EN LOS VASOS DEL ESTROMA CARUNCULAR DURANTE LA PLACENTACIÓN TEMPRANA.

Expresión de VEGF

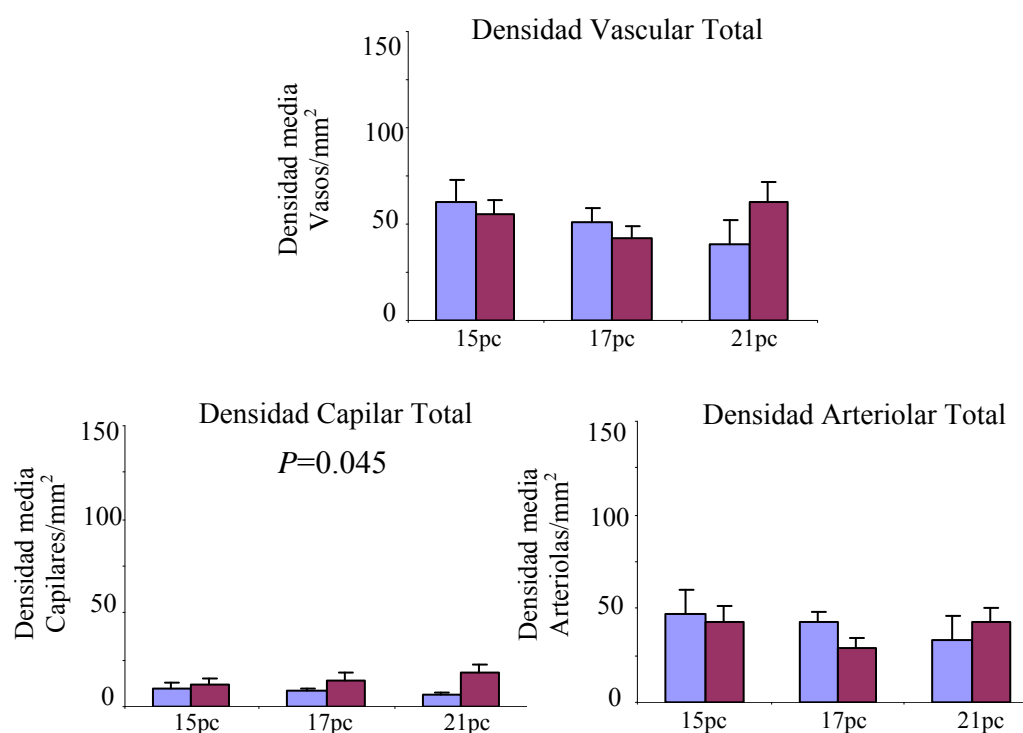
Las estructuras vasculares carunculares que expresaron VEGF, lo hicieron de manera uniforme en el citoplasma de las células endoteliales y sin diferencias en la intensidad de la inmunorreacción. También se observó positividad en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos de mayor calibre. Los resultados obtenidos referentes a la densidad vascular total en el estroma caruncular, junto con la densidad de estructuras capilares y arteriolas VEGF positivas, quedan reflejados en la **Gráfica 8**, así como en la **Figura 8a y 8b**.

No se demostraron diferencias significativas al comparar la densidad vascular total de VEGF entre ambos grupos de tratamiento o entre los días de estudio. Sin embargo, el patrón de expresión no coincidió en los dos grupos experimentales. Así, en el grupo PG se evidenció un decrecimiento continuo del día 15 al 21pc, mientras que en el grupo tratado con progestágenos hubo un incremento entre los días 15 a 17pc que estuvo seguido de una caída hasta el día 21pc.

Al analizar la densidad de capilares positivos a VEGF, se observó que ésta fue mayor en el estroma caruncular del grupo P en comparación con el del grupo PG ($P=0.045$). El patrón de expresión fue diferente entre ambos grupos experimentales, ya

que en el grupo P se observó un aumento en la densidad de capilares positivos hasta el día 21pc, mientras que en el grupo PG se describió un descenso iniciado en el día 15pc y mantenido a lo largo de toda la fase de estudio. A pesar de ello, las diferencias observadas entre los días no han demostrado significación estadística.

VEGF



Gráfica 8. Densidad vascular media de VEGF en el estroma caruncular durante los días 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). Los resultados han sido expresados en media ± error estándar.

No existieron diferencias entre días o grupos de tratamiento cuando se estudió la densidad de arteriolas VEGF-positivas ($P > 0.05$). Sin embargo, mientras que en el grupo PG se observó un descenso desde el día 15 al 21pc, el grupo tratado con progestágenos mostró una caída en la positividad en el día 17pc que fue seguida de un aumento hasta el día 21.

En el grupo PG, la densidad total de vasos que expresaron VEGF se correlacionó fuertemente con la densidad arteriolar ($r^2 = +0.944$, $P=0.000$) y en menor medida con la densidad capilar ($r^2 = +0.566$, $P=0.044$). El patrón fue similar en el grupo P, pero las correlaciones fueron ligeramente menores, tanto en relación con la densidad arteriolar ($r^2 = +0.888$, $P=0.000$) como con la capilar ($r^2 = +0.526$, $P=0.044$).

Expresión de CD31

Las estructuras vasculares carunculares positivas a CD31 mostraron una tinción de intensidad homogénea en el citoplasma de las células endoteliales. Los resultados obtenidos referentes a la densidad total de vasos, capilares y arteriolas que expresaron CD31 en el estroma caruncular han sido ilustrados en la **Gráfica 9**, y en la **Figura 8a** y **8b**.

Al evaluar la densidad total de estructuras vasculares positivas a CD31, se observó un descenso de la misma desde el día 15 al 21pc ($P=0.007$). Mediante la prueba de Duncan se especificó que la significación residía fundamentalmente en el día 21 (15-17pc^a, 21pc^b). Aunque no existió un respaldo estadístico, el patrón descrito en ambos grupos de tratamiento varió ligeramente. En el grupo PG se observó un pequeño incremento del número de vasos entre los días 15 y 17pc, para caer después. Sin embargo, el grupo P demostró un descenso continuo del día 15 al 21pc.

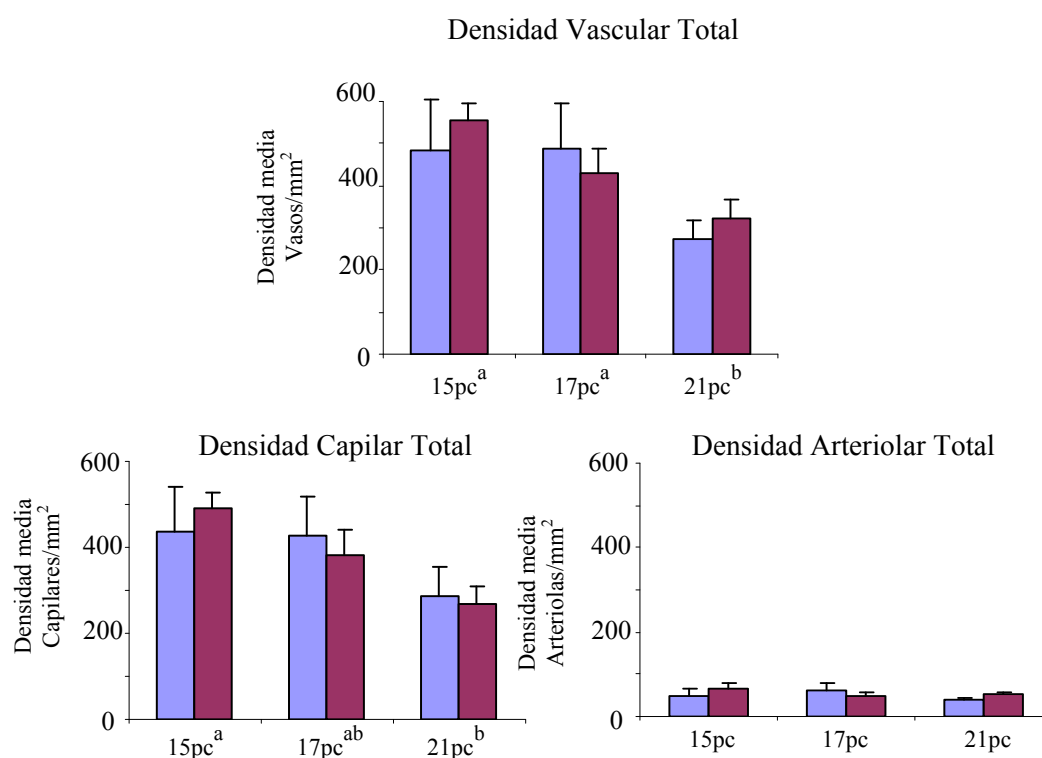
La densidad de capilares CD31-positivos también fue diferente entre los días de estudio, con una disminución hasta el día 21pc ($P=0.014$). El análisis *post hoc* indicó que la densidad en el día 15 difería significativamente de la del día 21pc (15pc^a, 17pc^{ab}, 21pc^b). En ambos grupos experimentales existió una densidad capilar similar, aunque el grupo P experimentó un descenso más homogéneo en comparación con el grupo tratado con análogos de prostaglandinas, donde se observó un descenso marcado entre los días 17 y 21pc.

En cuanto a la densidad arteriolar de CD31, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento o los días de estudio ($P>0.05$).

En los animales del tratamiento PG, la densidad vascular total mostró una fuerte correlación con la densidad capilar ($r^2 = +0.951$, $P=0.000$) y arteriolar ($r^2 = +0.795$, $P=0.001$), así como una alta correlación entre la densidad capilar y arteriolar ($r^2 = +0.807$, $P=0.001$).

Sin embargo, en el grupo P se observó una correlación entre la densidad total y la densidad capilar ($r^2 = +0.986$, $P=0.000$) mayor que en el tratamiento PG, aunque no se acompañó de la correlación con la densidad arteriolar. Además, los animales de celo sincronizado con progestágenos demostraron una correlación negativa entre la densidad de los capilares marcados con CD31 y la densidad total de vasos positivos a VEGF ($r^2 = -0.535$, $P=0.04$), que no fue observada en el grupo PG.

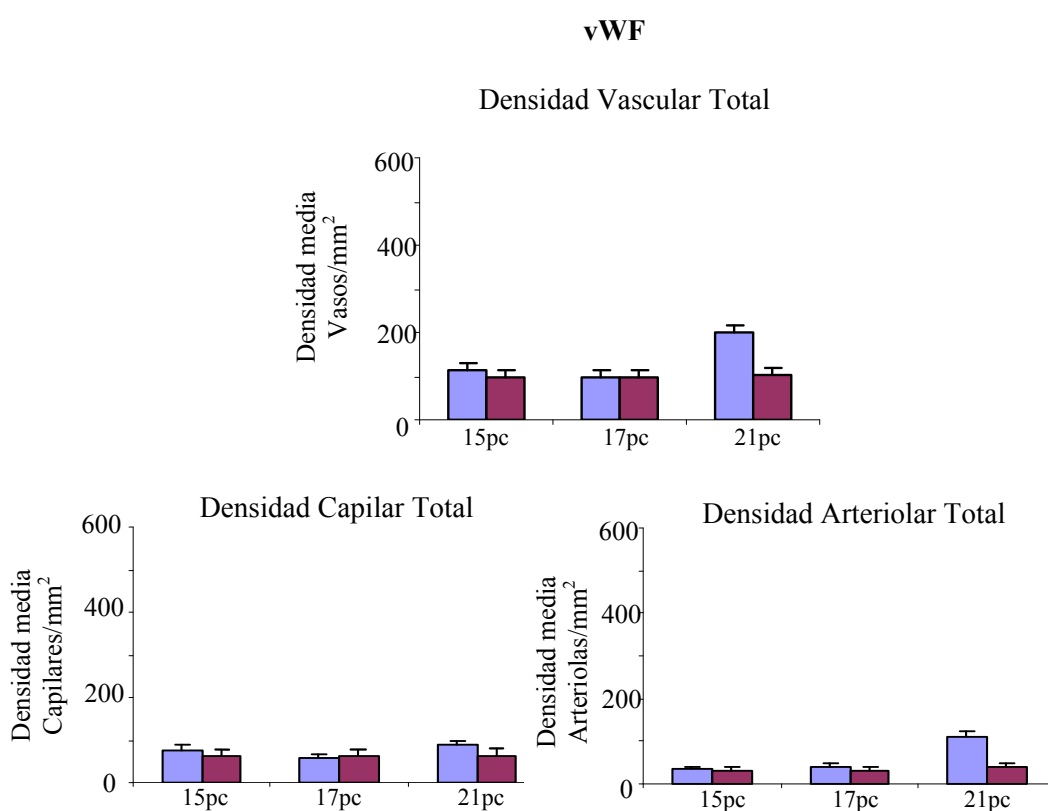
CD31



Gráfica 9. Densidad vascular media de CD31 en el estroma caruncular durante los días 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■).^(ab) indica diferencias significativas entre los días post-coito. Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

Expresión de Factor von Willebrand

La positividad a vWF en las estructuras vasculares carunculares se mostró en forma de una tinción de intensidad uniforme en el citoplasma de las células endoteliales. Los resultados referentes a la densidad total de vasos, capilares y arteriolas positivas a vWF en el estroma caruncular de ambos grupos experimentales han sido recogidos en la **Gráfica 10**, así como en la **Figura 8a y 8b**.



Gráfica 10. Densidad vascular media de vWF en el estroma caruncular durante los días 15pc, 17pc y 21pc en los animales tratados con análogos de prostaglandinas (■) y con progestágenos (■). Los resultados han sido expresados en media±error estándar.

Al valorar la densidad de las diferentes estructuras vasculares inmunorreactivas para vWF, no se demostraron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento o entre los días de estudio para ninguno de los parámetros analizados. Sin embargo, el grupo PG presentó una mayor positividad durante el día 21pc en todos los parámetros estudiados.

En el grupo PG, la densidad vascular total de vWF demostró estar fuertemente correlacionada con su densidad capilar ($r^2 = +0.873$, $P=0.000$) y arteriolar ($r^2 = +0.826$, $P=0.001$). En el grupo P, el patrón fue similar con respecto a la correlación entre la densidad vascular total y la densidad capilar ($r^2 = +0.844$, $P=0.000$), mientras que se manifestó en menor medida con respecto a la densidad arteriolar ($r^2 = +0.600$, $P=0.018$).

Iconografia

COMPARTIMENTOS UTERINOS

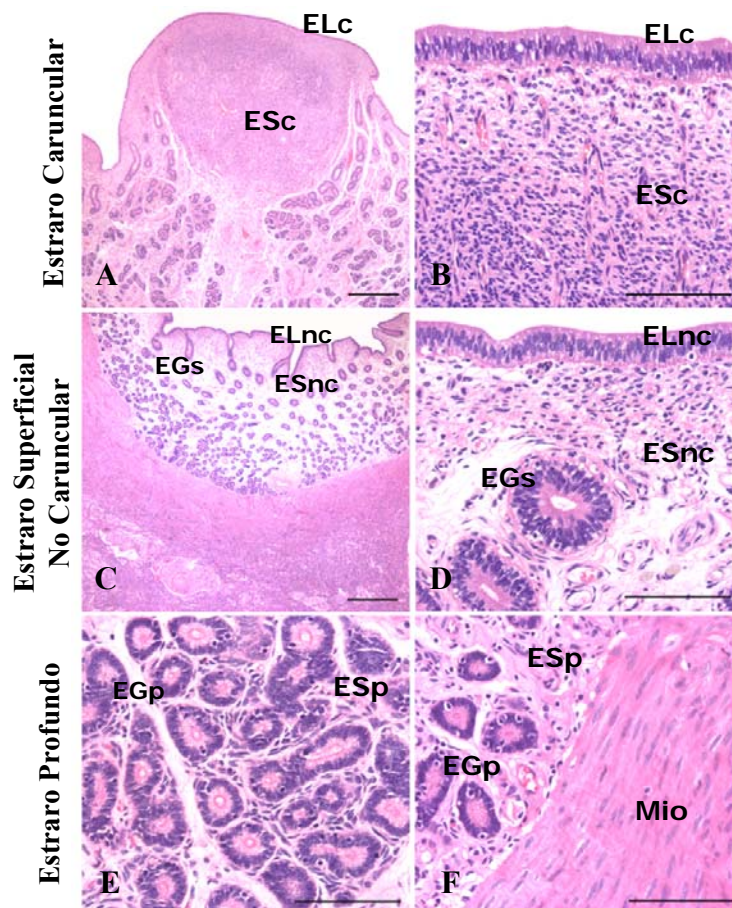


Figura 1. Diferentes compartimentos analizados en el útero ovino. A-B, estrato caruncular; C-D, estrato superficial no caruncular; E-F, estrato profundo. ELc, epitelio luminal caruncular; ESc, estroma caruncular; ELnc, epitelio luminal no caruncular; ESnc, estroma no caruncular; EGs, epitelio glandular superficial; EGp, epitelio glandular profundo; ESp, estroma profundo; Mio, miometrio. Técnica de hematoxilina-eosina. Bar: 400µm (A y C), 40µm (B,D,E,F).

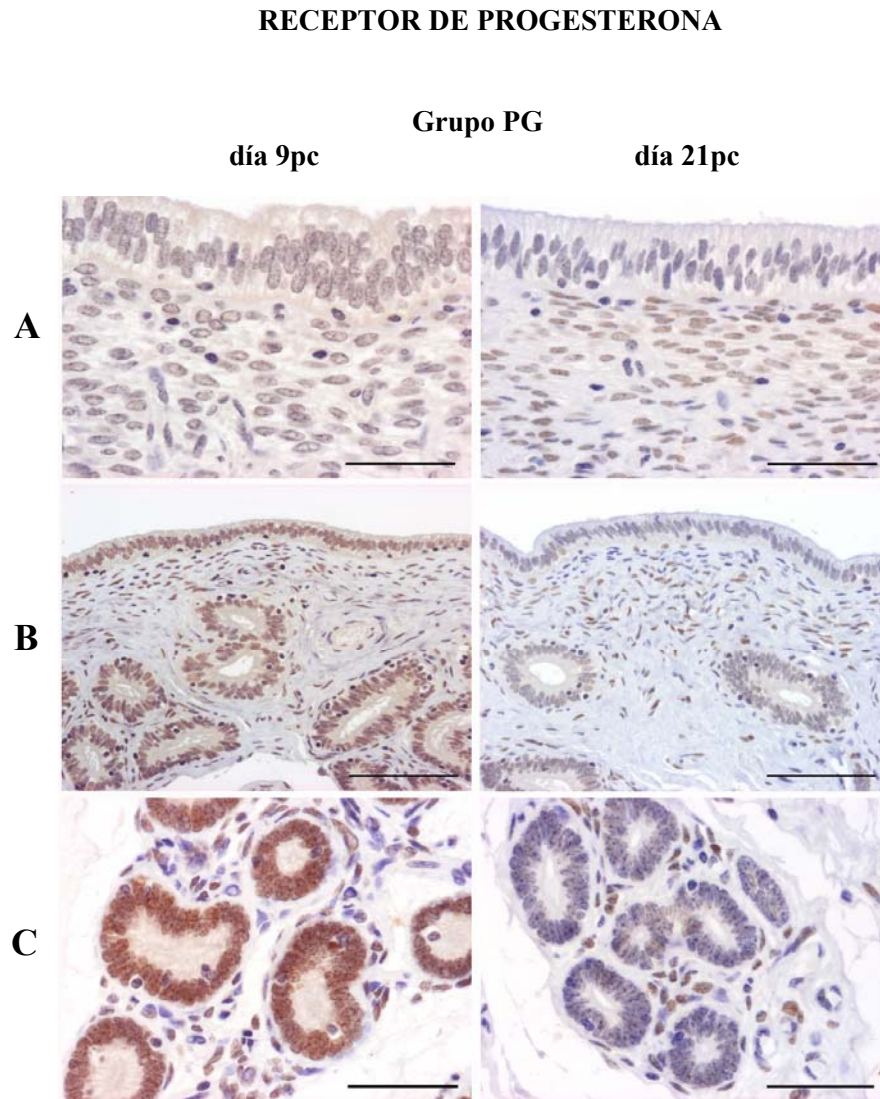


Figura 2.a. Inmunoexpresión de RP en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

RECEPTOR DE PROGESTERONA

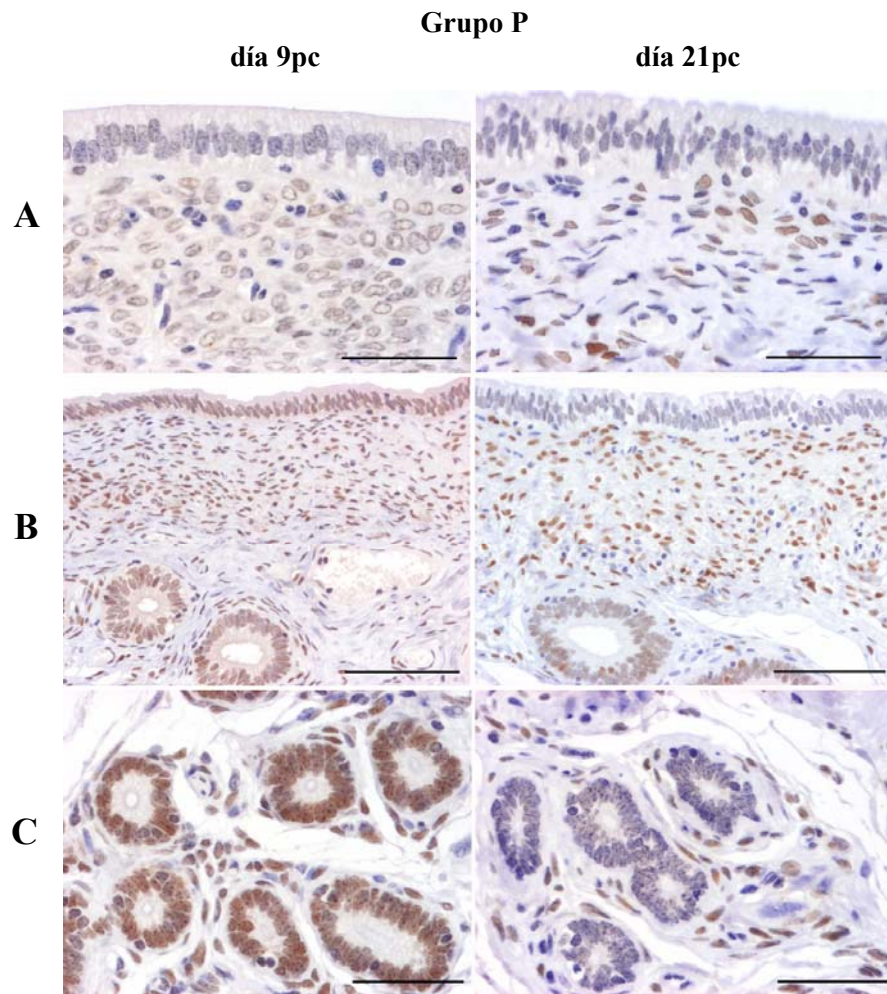


Figura 2.b. Inmunexpresión de RP en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

RECEPTOR DE INTERFERÓN DE TIPO I

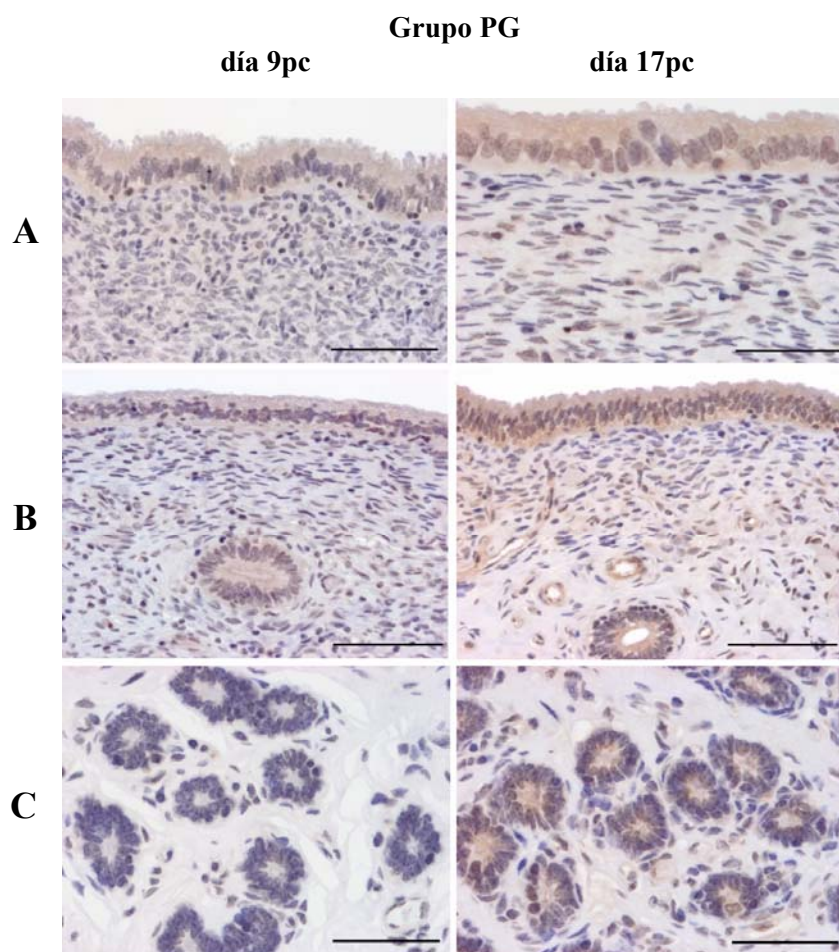


Figura 3.a. Inmunoexpresión de IFNAR en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 17pc en ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

RECEPTOR DE INTERFERÓN DE TIPO I

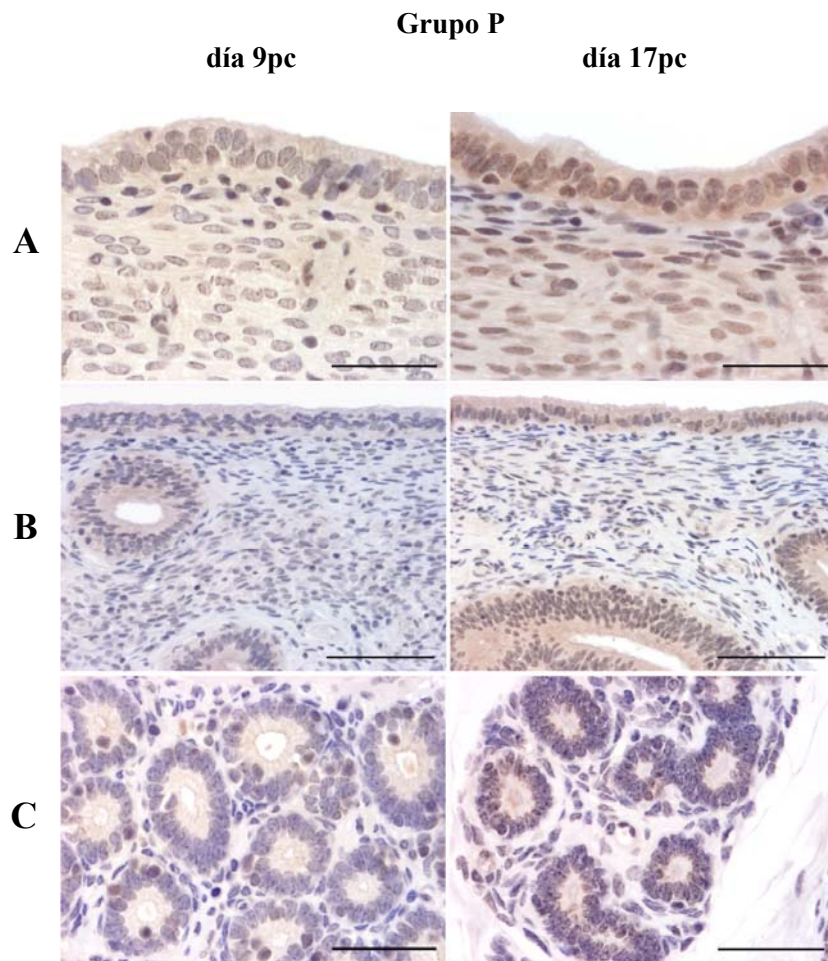


Figura 3.b. Inmunoexpresión de IFNAR en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 17pc en ovejas sincronizadas con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

RECEPTOR DE ESTRÓGENOS- α

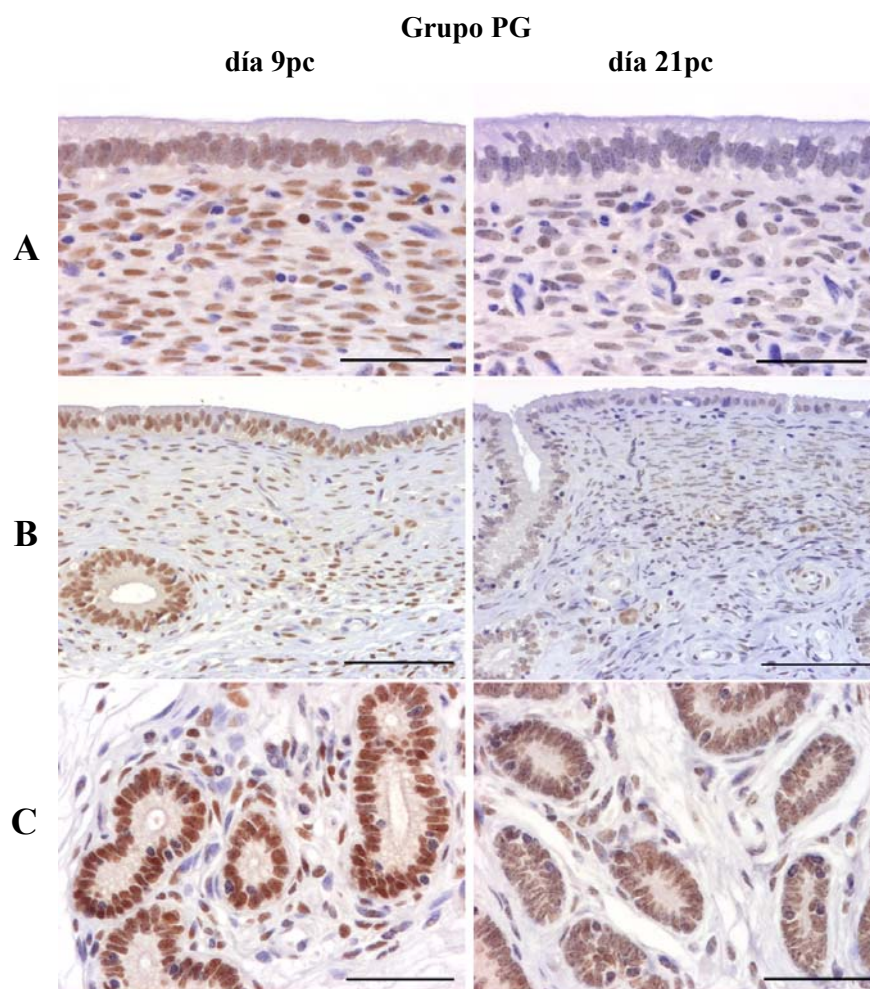


Figura 4.a. Inmunoexpresión de RE- α en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40 μ m.

RECEPTOR DE ESTRÓGENOS- α

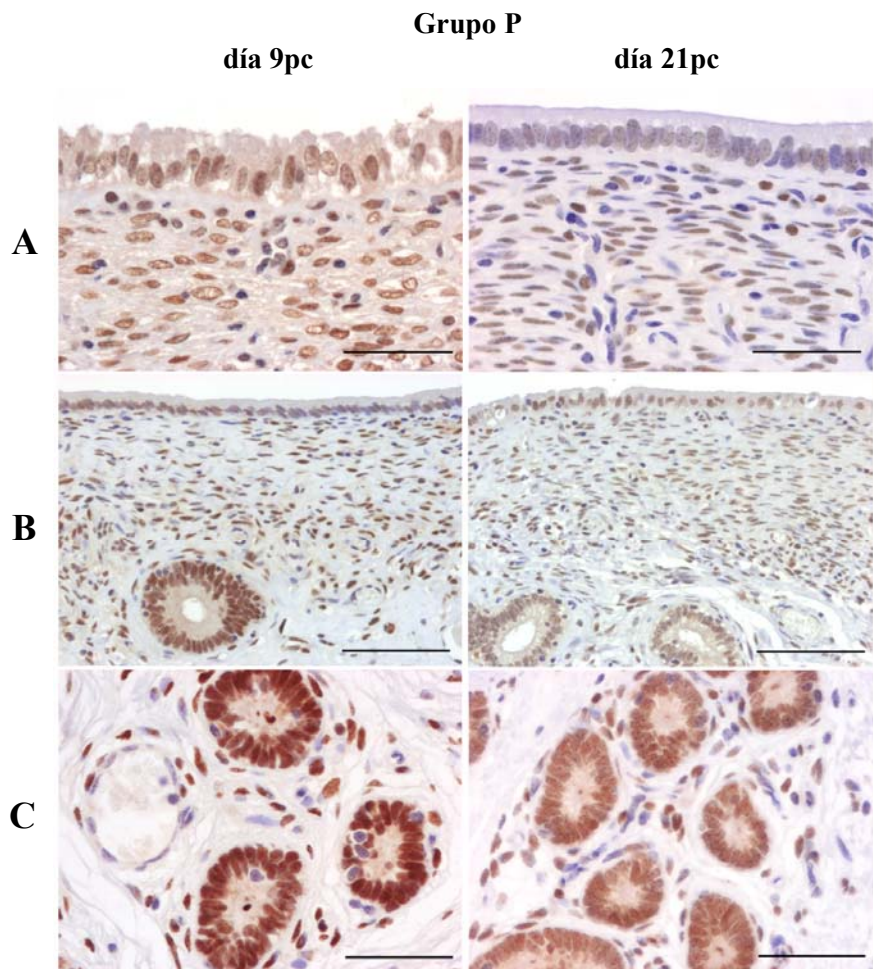


Figura 4.b. Inmunoexpresión de RE- α en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40 μ m.

RECEPTOR DE OXITOCINA

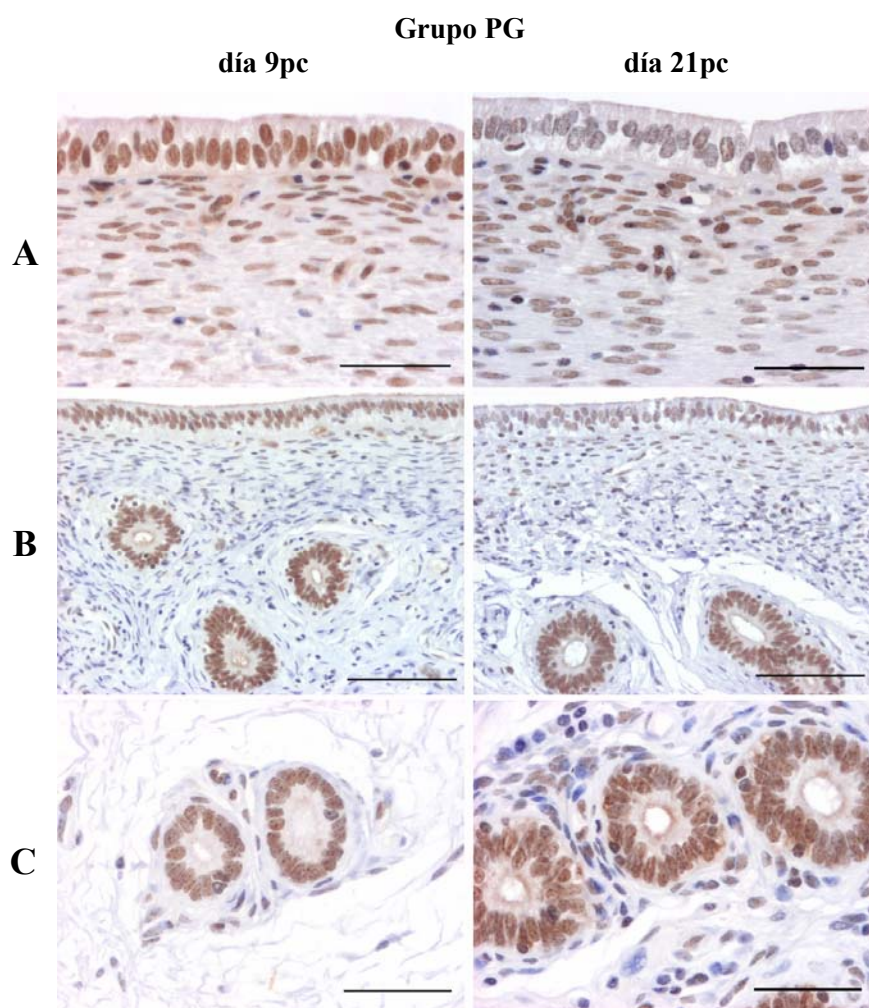


Figura 5.a. Inmunoexpresión de ROT en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

RECEPTOR DE OXITOCINA

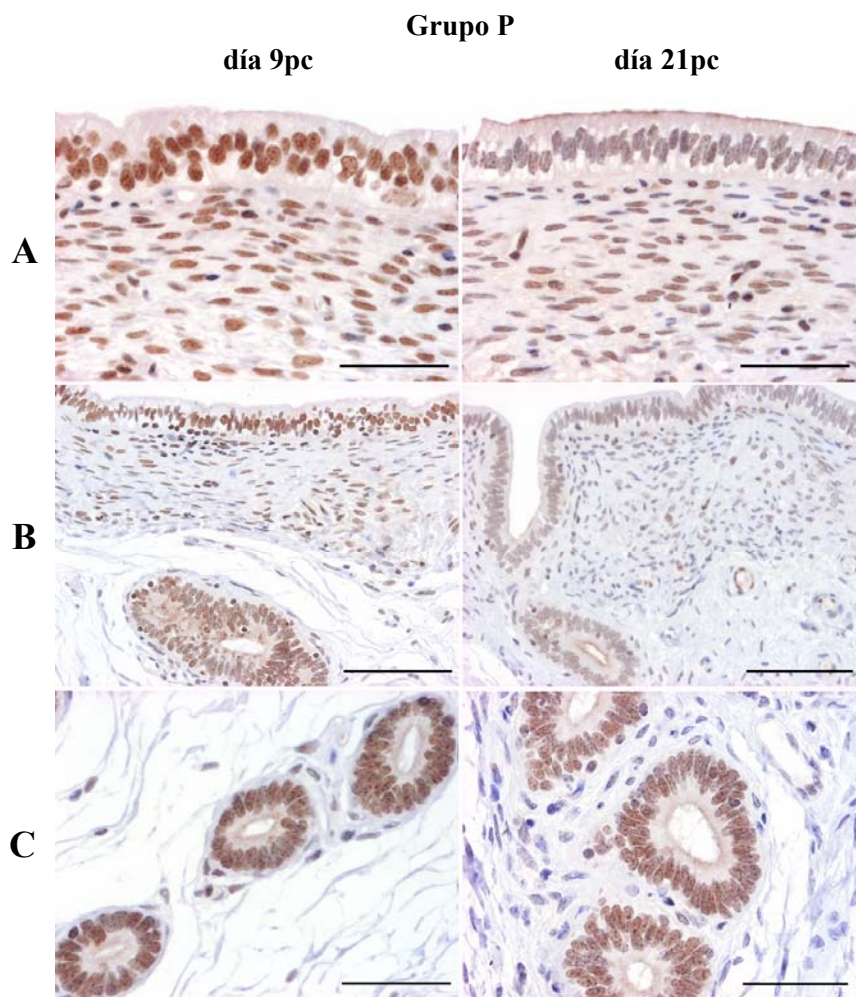


Figura 5.b. Inmunoeexpresión de ROT en diferentes compartimentos uterinos durante los días 9pc y 21pc en ovejas sincronizadas con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

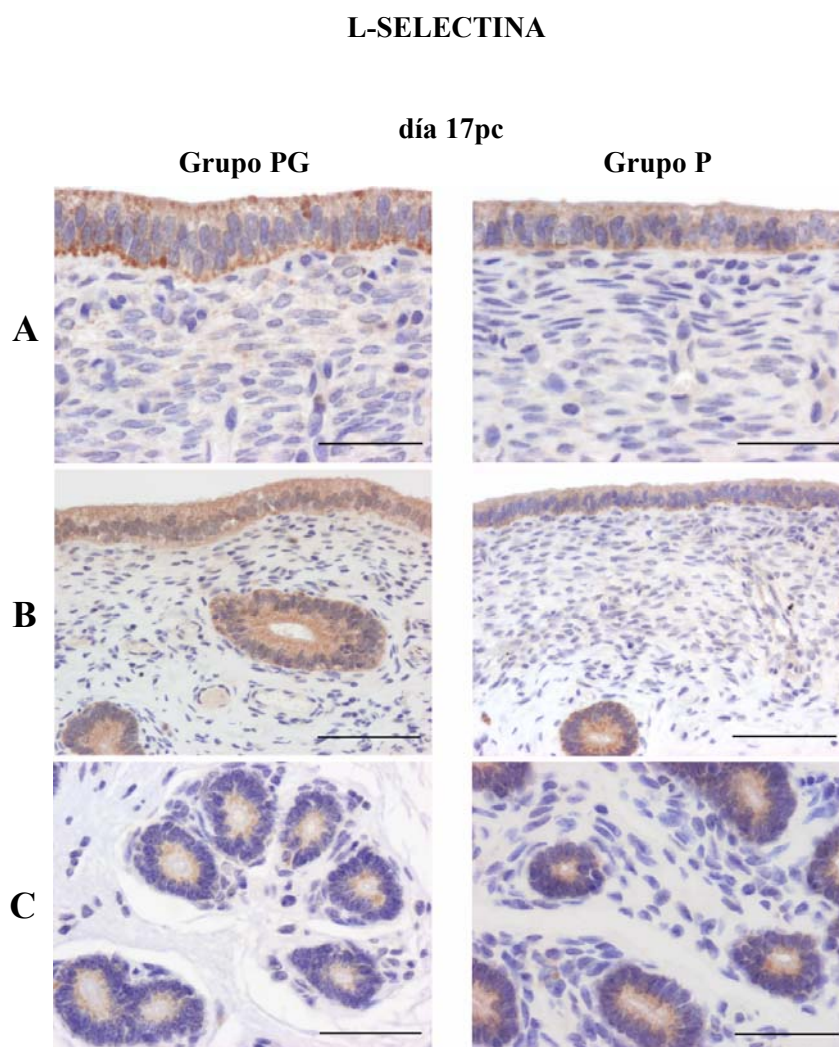


Figura 6. Inmunoexpresión de L-Selectina durante el día 17pc en diferentes compartimentos uterinos de ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG) y con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

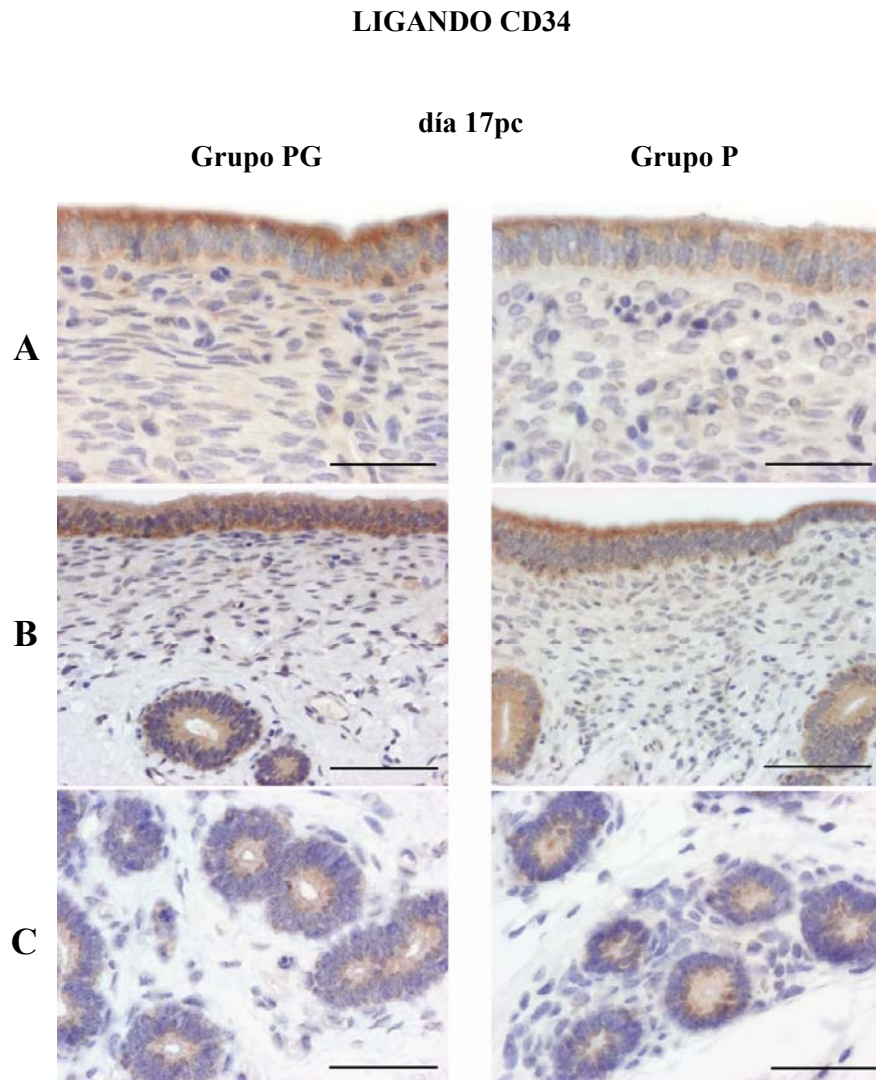


Figura 7. Inmunoeexpresión de CD34 durante el día 17pc en diferentes compartimentos uterinos de ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG) y con progestágenos (grupo P). A, Estrato Caruncular; B, Estrato Superficial No Caruncular; C, Estrato Profundo. Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

MARCADORES VASCULARES

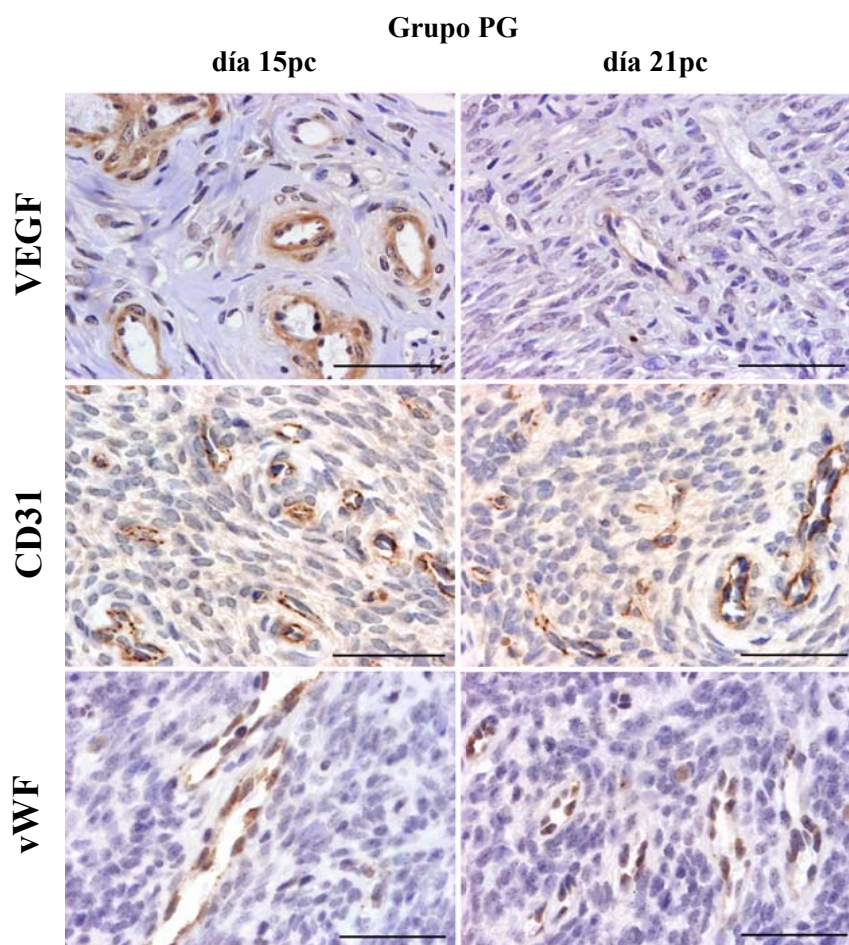


Figura 8.a. Inmunoeexpresión vascular durante los días 15pc y 21pc de VEGF, CD31 y vWF en el estroma caruncular de ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas (grupo PG). Técnica de estreptavidina peroxidasa. Bar=40µm.

MARCADORES VASCULARES

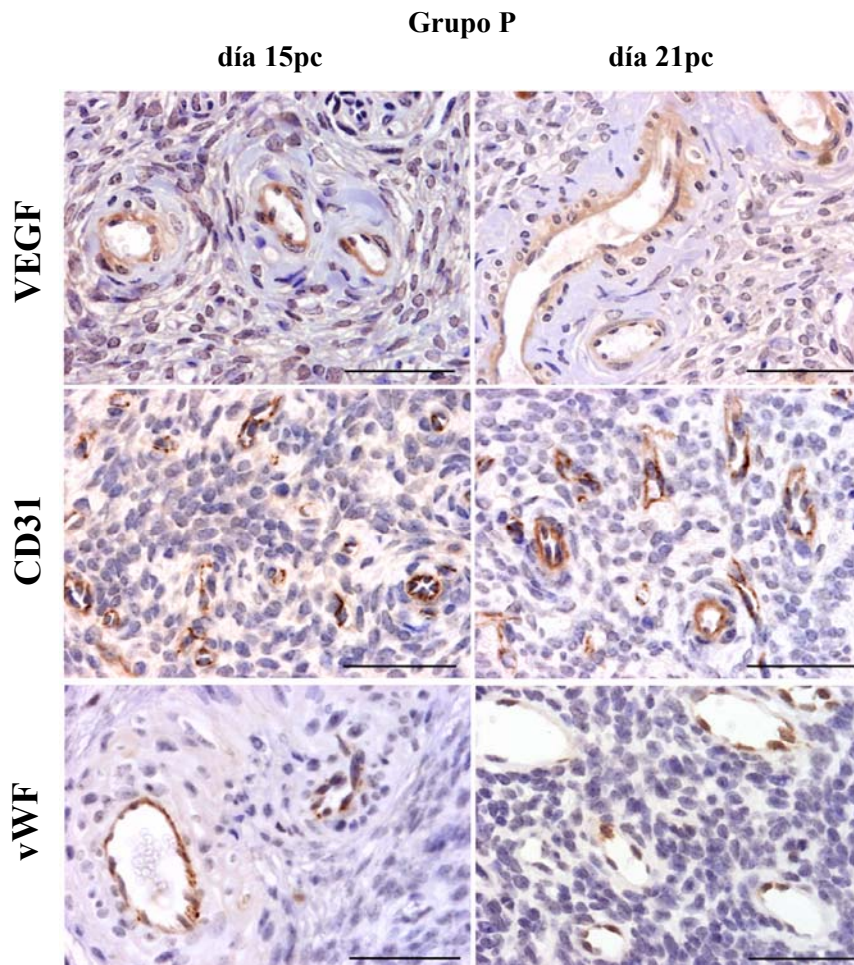


Figura 8.b. Inmunoexpresión vascular durante los días 15pc y 21pc de VEGF, CD31 y vWF en el estroma caruncular de ovejas sincronizadas con progestágenos (grupo P). Técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa. Bar=40µm.

Discusión

Los diferentes resultados descritos en la literatura tras comparar la eficacia de los tratamientos con progestágenos y con análogos de prostaglandinas para sincronizar el celo en la especie ovina, podrían estar relacionados con variaciones en la expresión uterina de los receptores esteroides, del receptor de interferón de tipo I, de ligandos de moléculas de adhesión o de factores relacionados con la angiogénesis caruncular durante la gestación temprana. En el presente estudio, los cambios observados en la expresión de estos elementos a lo largo de los días analizados confirman su implicación en la peri-implantación embrionaria ovina. Por otro lado, las diferencias observadas entre ambos grupos experimentales podrían contribuir a explicar los variables resultados reproductivos obtenidos al comparar ambos tratamientos.

1. NIVELES PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA

La progesterona está considerada como la hormona de la gestación por su papel fundamental en el desarrollo y supervivencia del embrión [59,113]. A través de su receptor inhibe la liberación de GnRH hipotalámica durante la fase luteal temprana, así como la expresión uterina de RE- α y de ROT, lo que interfiere con el desarrollo folicular en el ovario. Por otro lado, participa en la fase de implantación al estimular la producción de determinadas proteínas endometriales o histotrofo [21,61,71,113], cuya modificación fruto de mayores niveles de P₄ ha sido relacionada con un mayor crecimiento y desarrollo embrionario [18,70].

En nuestro análisis, hemos obtenido una concentración plasmática de progesterona post-ovulatoria más elevada en el grupo tratado con análogos de prostaglandinas a lo largo de todo el estudio (días 0 a 21pc). La capacidad de producir P₄ por el cuerpo lúteo está considerada como un indicador de la calidad del mismo [2,14,227,229], por lo que parece existir una insuficiencia luteal en el grupo de animales de celo sincronizado con progestágenos, evidenciable por su menor capacidad de secretar progesterona. Sin embargo, existen indicios de que el medio uterino tiene una gran sensibilidad para detectar concentraciones bajas de progesterona [244], por lo que la

menor producción post-ovulatoria en el grupo P podría ser suficiente para permitir el establecimiento de una gestación.

Por otro lado, es sabido que una concentración post-ovulatoria adecuada de P_4 plasmática se relaciona positivamente con la supervivencia embrionaria por su papel en la preparación uterina para la gestación [107,205,206,209]. La menor producción de P_4 luteal observada en el grupo de ovejas sincronizadas con progestágenos, podría resultar en un retardo de la secuencia preparatoria endometrial, y por lo tanto, en una asincronía entre el embrión y el útero, considerada como una de las principales causas de mortalidad embrionaria [197,199].

A pesar de ello, concentraciones altas de progesterona como las observadas en el grupo PG, también podrían comprometer la supervivencia del embrión [203,204,207] y acarrear problemas para la gestación [203], debido a que una elevada producción de P_4 acelera la preparación del endometrio, no pudiéndose compensar la diferencia entre el grado de maduración embrionaria y el estado del ambiente materno.

En estudios previos en ovejas cíclicas, la administración de progesterona en la fase luteal temprana resultó en un acortamiento del ciclo estral [245,246], debido posiblemente al adelanto de la retroalimentación negativa sobre la expresión de RP en los compartimentos superficiales, lo que favorecería el incremento del receptor de oxitocina y el desencadenamiento del mecanismo luteolítico.

En animales gestantes, este adelanto en la desaparición de RP podría ocurrir cuando el embrión no ha alcanzado aún el grado de maduración necesario para iniciar la liberación de $IFN\tau$ e impedir la luteolisis. En un trabajo realizado por Lawson y colaboradores [201], la transferencia de embriones a un medio hormonalmente adelantado se tradujo en una incapacidad para mantener la vida del CL y la gestación, ya que fueron capaces de compensar el tamaño, pero no de alcanzar el grado de maduración adecuado. Esto explicaría por qué los elevados niveles de P_4 en el grupo PG permiten obtener embriones en los días 4 y 7pc con mayor viabilidad y calidad aparentes [2], mientras que

los resultados reproductivos posteriores son peores que cuando se utilizan progestágenos [239].

2. RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA GESTACIÓN

Alrededor del día 9-13 de gestación, el embrión en desarrollo señala su presencia al producir IFN τ . Mediante la unión a su receptor IFNAR en el endometrio, inhibe el mecanismo luteolítico mediado por RE- α y ROT con el fin impedir que se inicie un nuevo ciclo y mantener la gestación [21]. Tal y como se ha propuesto previamente [57,64,86,110], nuestros resultados indican la existencia de un control espacio-temporal de la expresión de los receptores RP, IFNAR, RE- α y ROT durante la gestación temprana y periodo peri-implantacional ovino, observándose claras diferencias a medida que avanza la gestación y según el compartimento uterino analizado.

Se sabe que en ovejas cíclicas, la progesterona ejerce una retroalimentación negativa sobre la expresión de su receptor en el epitelio superficial del endometrio, provocando la disminución de RP entre los días 11 y 13 [59,247]. Durante la gestación, trabajos previos indican que este receptor desaparece de los compartimentos epiteliales superficiales entre los días 13-19 [19,59,247]. Otros estudios establecen que la presencia de RP entre los días 15 y 25 de gestación se limita al estroma y al miometrio [57], donde la progesterona induce la producción de progestamedinas estromales [70,210] y mantiene la quiescencia muscular necesaria durante la gestación [59,64].

A diferencia de estas observaciones, en ambos grupos experimentales encontramos niveles detectables del receptor de progesterona después del día 15 en otros tipos celulares uterinos, especialmente en las glándulas profundas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Okumu y colaboradores en endometrio bovino [248]. Cuando analizamos la presencia de RP en el útero a lo largo de nuestro estudio (días 9 a 21pc), observamos cambios significativos de expresión en todos los compartimentos epiteliales (luminal y glandular), manteniéndose un patrón similar en los dos grupos experimentales. En el estroma caruncular también se obtuvieron variaciones en función del día de

gestación, mientras que el receptor se mantuvo constante en el miometrio y en las células del estroma no caruncular y estroma profundo.

Es sabido que durante el ciclo estral, la ausencia de RP en el epitelio superficial desencadenaría el mecanismo luteolítico mediado por $\text{PGF}_{2\alpha}$, al permitirse el aumento de $\text{RE-}\alpha$ y ROT a este nivel alrededor del día 13 [59,81]. En caso de gestación, el embrión sintetiza $\text{IFN-}\tau$ entre los días 10 y 21, el cual actúa de forma paracrina en el útero al unirse a IFNAR [110,113], señalizando su presencia en el ambiente materno [239]. La función principal de $\text{IFN-}\tau$ es la inhibición de $\text{RE-}\alpha$ y ROT en el EL y EGs para evitar la luteolisis [57,81,250], además de inducir y/o aumentar la expresión de genes regulados por interferón (ISGs) en el estroma y glándulas profundas, los cuales son importantes en la adaptación endometrial peri-implantacional [19,71,112].

Se ha sugerido que la expresión endometrial de IFNAR es modulada por el embrión a través de la secreción de $\text{IFN}\tau$, ya que se ha observado una mayor presencia del receptor en ovejas gestantes y coincidiendo con los días de mayor concentración de interferón [109,110]. En nuestro trabajo, el patrón de expresión de IFNAR fue analizado durante un periodo temporal más largo, lo que nos permitió establecer diferencias principalmente en el epitelio luminal (caruncular y no caruncular), coincidiendo con el compartimento en el que es más abundante [110]. Así, el patrón demostrado por IFNAR en el estrato superficial a lo largo del presente estudio imita el descrito para su ligando $\text{IFN}\tau$ durante la gestación temprana [19], por lo que nuestros resultados avalan la idea de que la expresión endometrial del receptor puede estar regulada por la presencia del embrión y la liberación de $\text{IFN}\tau$ [111]. Además, a diferencia de lo descrito por Rosenfeld y colaboradores [110], los cuales señalan que esta proteína se expresa únicamente en la zona superficial del endometrio, localizamos niveles detectables de la proteína IFNAR en las glándulas profundas durante todo el estudio. No obstante, su expresión en este compartimento fue menos intensa y presentó menos variaciones en el tiempo que la observada en los compartimentos superficiales.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, durante la gestación se mantiene inhibida la expresión uterina de RE- α mediante una acción conjunta de la progesterona e IFN τ [85,86]. Este hecho queda respaldado por nuestros resultados, en los que se muestra cómo RE- α experimenta una disminución gradual desde el día 9 hasta el día 21pc en ambos grupos de tratamiento, aunque obteniéndose siempre niveles detectables de este receptor en todos los compartimentos estudiados. Trabajos previos realizados en rumiantes, coinciden en señalar la presencia uterina de RE- α en los días 16 y 24 de gestación [248,251], aunque Cherny y colaboradores [252] han indicado que la proteína inmunorreactiva de RE- α se detecta sólo en el estroma caruncular profundo en el día 15 de gestación.

Como ya ha sido descrito previamente, la inhibición del gen de RE- α por parte de IFN τ modula la expresión del receptor de oxitocina durante la fase peri-implantacional ovina [57,81], lo cual ha sido observado en ambos grupos experimentales estudiados. La acción conjunta de la progesterona y de IFN τ sobre el receptor de estrógenos- α induce la caída de ROT en los compartimentos superficiales para evitar los pulsos luteolíticos de PGF $_{2\alpha}$. Coincidiendo con la literatura previa [253], hemos observado que en los compartimentos profundos la expresión de ROT se mantiene de forma más o menos constante. Por el contrario, en otros trabajos [64] no pudieron identificar señal inmunohistoquímica para ROT en ningún compartimento uterino entre los días 14 y 21 de gestación.

Comparando más en profundidad las diferencias obtenidas entre los días post-coito en cuanto a la expresión conjunta de todos estos receptores, observamos que ambos grupos de tratamiento muestran una caída drástica de RP entre los días 9pc y 13pc en el epitelio luminal y glandular superficial. La desaparición de RP se acompaña de un aumento progresivo en la expresión de IFNAR en el endometrio superficial, y de un descenso del receptor de estrógenos- α y del de oxitocina en los compartimentos epiteliales y estromales superficiales, coincidiendo con los eventos previamente descritos durante este periodo de la gestación temprana ovina [18,21,71,81].

Curiosamente, las ovejas de celo sincronizado con análogos de prostaglandinas mostraron en el día 9pc una mayor expresión de todos estos receptores en la mayoría de los compartimentos uterinos, aunque no se observó significación estadística al comparar con el grupo de progestágenos. Este hecho podría deberse a la mayor concentración de progesterona plasmática post-ovulatoria observada en el grupo PG. Del mismo modo, la mayor expresión de IFNAR en el grupo PG durante este periodo inicial podría estar relacionada con una mayor secreción de IFN τ por parte del embrión [111], al estar bajo la influencia de un medio uterino sometido a niveles supra-normales de P₄ [202,254,255].

La exposición del endometrio a estos mayores niveles de progesterona podría adelantar el inicio de la retroalimentación negativa sobre RP, perdiéndose prematuramente el bloqueo sobre la expresión de RE- α y ROT [18,81,248,256] en un momento en que la presencia de IFN τ no ha alcanzado todavía esta capacidad [19,21]. Esto explicaría el aumento de la inmunorreactividad de los receptores de estrógenos y oxitocina observada entre los días 9 y 13pc en los compartimentos epiteliales superficiales del grupo PG. Además, la expresión de ROT en las células estromales superficiales fue también mayor en el grupo tratado con análogos de prostaglandinas durante estos primeros días del estudio.

A partir del día 12 de gestación, el mantenimiento de RP en las células estromales permite a la progesterona inducir la expresión de progestamedinas [70,210,247], las cuales regulan genes necesarios para la implantación y desarrollo embrionario en las células epiteliales uterinas [21,209,210]. En nuestro estudio, las células del estroma no caruncular (superficial y profundo) presentaron niveles semejantes de expresión de RP en ambos grupos experimentales, mientras que en el estroma caruncular se observó un patrón diferente entre ambos lotes. Así, en el grupo PG la expresión caruncular de RP fue máxima el día 15pc y disminuyó posteriormente, mientras que en el grupo P existe un aumento progresivo hasta el día 21pc. Esta menor presencia del receptor de progesterona en los animales tratados con prostaglandinas podría tener como consecuencia una insuficiente producción de progestamedinas en este grupo de tratamiento, debida a una menor sensibilidad a P₄ en el estroma caruncular a medida que avanza la gestación.

Paralelamente, la expresión de IFNAR fue incrementándose, de manera que en los días 15-17pc se observaron sus mayores niveles en el epitelio luminal, compartimento en mayor contacto con el embrión, coincidiendo con el día en que se alcanza la concentración máxima de IFN τ en la luz uterina [18,71,249]. Sin embargo, en los animales del grupo tratado con análogos de prostaglandinas IFNAR no alcanzó su mayor valor hasta el día 17pc. En cambio, en el grupo P se demostró la máxima expresión de IFNAR en el EL caruncular ya en el día 15pc, coincidiendo con la localización donde se iniciará la unión con el embrión [21,257].

Como ya se ha mencionado, además de su papel antiluteolítico IFN τ actúa en colaboración con la progesterona para modular multitud de genes en el estroma [19,59]. De este modo, a partir del día 15pc la expresión de RE- α desciende en las células del estroma y del miometrio en ambos grupos de tratamiento, coincidiendo con el aumento en la expresión de RP a estos niveles. Sin embargo, en el grupo de progestágenos la expresión de RE- α disminuye de manera progresiva desde el día 9 hasta el 21pc, mientras que en el grupo PG se describe un cambio brusco del día 15pc al día 17-21pc, siendo esta diferencia más notoria en el estroma superficial. Este patrón observado en ambos grupos podría estar relacionado con el momento en que el endometrio responde a las mayores concentraciones de IFN τ [19], relacionadas con la expresión máxima de IFNAR alcanzada en diferentes momentos del estudio según el lote de tratamiento.

Además, la expresión de ROT en el grupo P muestra un descenso constante desde el día 9pc hasta el día 21, siguiendo un patrón semejante al encontrado para RE- α . Esto podría indicar que en este grupo existe un relevo sincronizado entre la acción de bloqueo ejercido por la progesterona y el efecto de IFN τ . Sin embargo, en el grupo PG el nivel de ROT fue superior en los compartimentos superficiales, pese a que en este grupo existe una aparente mayor expresión de RP e IFNAR, que se traduce en una mayor inhibición del receptor de estrógenos a este nivel durante los días 15-21pc, pero que no coincide con una menor inmunorreacción de ROT. Esto podría deberse a una modulación del receptor de oxitocina más independiente de RP, RE- α e IFN τ en este grupo de tratamiento.

Por el contrario, el receptor de oxitocina en el grupo PG describió ligeros aumentos de expresión en los compartimentos profundos, más acorde con los niveles de RE- α que en los estratos superficiales. Mientras, las ovejas del grupo P mantuvieron niveles menos variables en las glándulas profundas, estroma profundo y miometrio.

En conjunto, los resultados obtenidos indican la existencia de una regulación espacio-temporal de estos receptores durante la fase de reconocimiento maternal de la gestación ovina, tras haberse demostrado cambios en su expresión a medida que la gestación avanza y al analizar los diferentes compartimentos uterinos en ambos grupos experimentales. Aunque la mayoría de las diferencias encontradas no presentaron una significación estadística, se observaron distintos patrones de respuesta uterina según el tratamiento de sincronización de celo utilizado. El mayor nivel de P₄ plasmática observado en el grupo tratado con prostaglandinas podría inducir una receptividad uterina a la llegada del embrión más adecuada, mediada por una mayor expresión de IFNAR durante los primeros días de estudio. Sin embargo, la pérdida prematura del control de la progesterona sobre RE- α en los compartimentos superficiales de este mismo grupo de tratamiento, podría hacer que se desarrollase una interferencia con el control de la expresión uterina de ROT a partir del día 13-15pc.

3. ADHESIÓN EMBRIONARIA E IMPLANTACIÓN TEMPRANA

En el presente estudio hemos localizado la proteína inmunorreactiva de L-Selectina (CD62L) en el epitelio endometrial ovino (luminal y glandular), confirmando su presencia durante la gestación temprana en esta especie, aunque sin demostrar variaciones entre los diferentes días estudiados. Del mismo modo, nuestro estudio es el primero en describir la inmunoexpresión del ligando CD34 en las células epiteliales del útero ovino gestante, ya que en la bibliografía consultada no se han encontrado referencias al respecto. Ambas moléculas mostraron niveles detectables en todos los días de estudio, expresándose de forma mantenida desde el día 15 a 21pc en los dos grupos experimentales.

En los rumiantes domésticos existe una larga fase de pre-implantación que precede al momento de la aposición y posterior fusión de las células binucleadas del embrión con el epitelio uterino para formar un sincitio, el cual permite la unión firme del embrión con el medio materno y constituye el inicio de la placentación [71,258]. En la oveja, la implantación es de tipo no invasiva [20] y comienza en el día 15-16 de gestación para completarse hacia el día 50-60 [19].

Las integrinas están involucradas en la adhesión uterina con el embrión, y en numerosas especies se ha descrito la activación y modificación estructural de estas moléculas ya en la fase pre-receptiva del útero [23,25,98,124,125,126,258]. Sin embargo, en la oveja, las integrinas se expresan de manera constitutiva y sin demostrar variaciones durante la gestación temprana [19,21,24,25,98]. Por lo tanto, no parecen actuar como factor limitante durante la fase de implantación en esta especie y se busca otras moléculas que puedan estar implicadas en esta fase de la gestación.

La molécula L-Selectina y sus ligandos han sido propuestos en humana como biomarcadores de receptividad uterina durante la implantación [259]. Genbacev y colaboradores [27] describieron cambios de expresión durante la ventana de la implantación, además de observar alteraciones sobre el proceso de adhesión cuando el sistema de la L-Selectina era bloqueado mediante anticuerpos específicos. Se ha sugerido que la L-Selectina presente en el trofoblasto facilita la implantación temprana al interactuar con sus ligandos endometriales [27], los cuales son expresados en mayor medida durante este periodo [119].

En nuestro trabajo, no hemos encontrado variaciones en la presencia de L-Selectina durante los días incluidos en el estudio. Al analizar el patrón de expresión en el endometrio ovino durante esta fase de implantación temprana, pudimos observar una clara diferencia entre la presencia de esta molécula en los estratos superficiales y el compartimento profundo. Así, obtuvimos niveles elevados de CD62-L en el EL y EGs de ambos grupos experimentales, en comparación con la escasa expresión observada en las glándulas profundas. Esta misma distribución fue demostrada al analizar la presencia del ligando CD34. Al no haberse encontrado cambios significativos entre los días del estudio,

podría sugerirse que, al igual que ocurre con las integrinas, la expresión de CD62L y de CD34 en las células epiteliales del endometrio ocurre de forma constitutiva e independiente de los procesos propios de la fase peri-implantacional en el útero ovino. Sin embargo, los compartimentos donde se inicia la adhesión con el embrión [260] son aquellos en los que se expresó una mayor abundancia de estas proteínas, lo que sugiere su implicación en la implantación temprana ovina.

Estudiando más en profundidad, observamos que la expresión de L-Selectina en el epitelio luminal depende del compartimento uterino analizado. En el epitelio de la zona caruncular, la proteína inmunorreactiva de CD62L mostró un patrón de descenso gradual hasta el día 21pc, mientras que su expresión se mantuvo entre los días 15-21pc en el epitelio de la zona no caruncular. Es sabido que la carúncula es el primer sitio de unión con el embrión para formar el sincitio, por lo que la decreciente expresión en el EL caruncular podría deberse precisamente a la pérdida en el número de células epiteliales tras su fusión con las células binucleadas del embrión [71,261]. La presencia de L-Selectina en las glándulas superficiales describió un patrón ligeramente diferente entre ambos grupos experimentales, observándose un descenso en el grupo PG y un incremento en el grupo P. La importancia del compartimento glandular durante el establecimiento de la gestación ha sido ya demostrada [21,100,262], por lo que la mayor expresión observada dentro de este compartimento en los animales del grupo tratado con progestágenos podría beneficiar los mecanismos de adhesión embrionaria.

Al igual que la L-Selectina, tampoco se han mostrado variaciones en la expresión de CD34 al estudiar los días de gestación o grupos de tratamiento. Las diferencias de expresión de GlyCAM-1 en el estrato superficial del endometrio ovino, observadas al comparar el ciclo estral y la gestación en estudios previos [26], permitieron sugerir que su presencia podría estar regulada primero por la progesterona y posteriormente por el embrión. En la mujer, se ha propuesto la existencia de un mecanismo regulador de la expresión de estos ligandos por parte de las hormonas sexuales durante la fase luteal [138], aumentando su expresión durante la ventana de la implantación [29] y mejorando las tasas de gestación [263]. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio no

nos permiten confirmar la existencia de una influencia hormonal sobre el ligando CD34 en la especie ovina, tal y como se había propuesto anteriormente para GlyCAM-1.

4. PLACENTACIÓN TEMPRANA

El presente trabajo ha permitido constatar la existencia de cambios en la estructura vascular de las carúnculas uterinas durante la gestación temprana ovina. En la oveja, el intercambio metabólico materno-fetal tiene lugar en los placentomas, formados durante la placentación a partir de la unión de la carúncula con el cotiledón placentario [142].

Hemos observado un descenso en el número de vasos sanguíneos positivos a CD31 en las carúnculas endometriales entre los días 15 y 21pc en ambos grupos experimentales. Durante la placentación inicial, se produce una ampliación de la red vascular endometrial y la neovascularización en los tejidos fetales, seguida de la reorganización y remodelación de las nuevas estructuras con el fin de asegurar el flujo sanguíneo necesario para cubrir las crecientes necesidades metabólicas del embrión en desarrollo [31,143,144]. La evolución observada en nuestro trabajo podría estar relacionada con ese aumento inicial de las estructuras vasculares y del número de células endoteliales [30,172], que implica una mayor expresión de CD31, seguido de la reorganización vascular y aumento del diámetro de los vasos, lo que explicaría el descenso posterior de esta molécula, de acuerdo con observaciones previas hechas en oveja [30,145,264], tití común [172] o mono *rhesus* [265].

Por otra parte, hemos encontrado que la expresión de VEGF experimentó un patrón inverso al observado para el marcador CD31. Es sabido que la molécula angiogénica VEGF colabora activamente en el proceso de remodelación vascular, ya que participa en la estabilización de los neovasos y la modulación de su permeabilidad [155,266-268], por lo que parece lógico esperar que se obtenga una mayor inmunorreactividad en las fases finales de nuestro estudio.

Debido a la demostrada implicación de VEGF y sus receptores en los procesos de neovascularización durante la gestación ovina [30,31], así como en otro gran número de especies incluída la mujer [160,161,166,168,269], existe un creciente interés en conocer los factores que podrían influir en su expresión y en el efecto que pudieran tener sobre ellos los tratamientos de reproducción asistida o de sincronización de celo.

En nuestro estudio, la densidad total de vasos que expresaron la proteína inmunorreactiva de VEGF fue mayor en los animales tratados con progestágenos que en el lote de animales tratados con análogos de prostaglandinas. También en ese grupo se observó un incremento de la inmunoexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular hasta el día 21pc, mientras que en el grupo PG la expresión decreció de forma continua. La respuesta obtenida en el grupo P es semejante a la descrita con anterioridad en diferentes especies, donde se ha encontrado un aumento de la positividad endotelial de VEGF [165,270] y sus receptores [165,166,270] durante la gestación temprana.

En el grupo P, entre los días 15 y 17pc encontramos un ligero descenso en la densidad vascular total y en el número de arteriolas que expresaron VEGF, similar al patrón descrito por Kaczmarek y colaboradores [167] cuando analizaron esta proteína en las fases iniciales de la placentación porcina. Por otro lado, al comparar el número de capilares positivos a VEGF, el grupo P mostró un incremento constante desde el día 15 al 21pc que no fue observado en el grupo tratado con análogos de prostaglandinas. Este aumento puede atribuirse a una reorganización vascular más activa y un mayor estímulo sobre el incremento en el diámetro de los pequeños neovasos [30,145,172], lo que resultará en un mayor número de estructuras capilares en este grupo de tratamiento.

Como hemos mencionado con anterioridad, en ambos grupos de tratamiento la inmunoexpresión de CD31 mostró una disminución al comparar el primer y último día de nuestro estudio. Si bien en el grupo P este descenso se produjo de forma gradual, en el grupo PG la actividad angiogénica se mantuvo entre los días 15 y 17pc, produciéndose posteriormente un descenso brusco en el día 21pc. Este diferente patrón de disminución podría estar relacionado con la mayor producción de progesterona post-ovulatoria observada en el grupo PG, lo que podría acelerar los mecanismos tempranos de

preparación uterina [205] y favorecer una posterior asincronía materno-fetal que acabaría con la gestación [197,199]. Está establecido que las hormonas esteroides ováricas intervienen en la adaptación vascular durante la gestación, tanto en la mujer [159,271,272], como en la cerda [156,166] o en la oveja [143].

De acuerdo con lo mencionado a lo largo de esta discusión, en los animales de celo sincronizado con prostaglandinas se vislumbra una descoordinación de los principales receptores involucrados en la receptividad maternal (RP, RE- α , IFNAR, ROT) una vez se inicia la comunicación materno-embionaria. Esta falta de sincronía, entre la señalización embionaria y la preparación uterina durante las fases de reconocimiento maternal e implantación temprana [19,273], podría alterar también el estímulo del proceso angiogénico endometrial requerido para iniciar la placentación.

Otro factor que podría ser relevante en la diferente respuesta angiogénica caruncular, observada entre ambos grupos de tratamiento, es la mayor inmunoexpresión estromal de RP descrita al inicio de este estudio en el lote de animales sincronizados con progestágenos. Como hemos mencionado con anterioridad, las células del estroma continúan expresando este receptor hormonal una vez que desaparece de las células epiteliales superficiales [18,61,70,247]. Por ello, este compartimento es el más implicado en los procesos de neovascularización durante la gestación [274-276], ya que se ha observado una abundante expresión estromal de VEGF durante la gestación temprana [277], así como una intensa positividad del sistema VEGF en este estrato en comparación con el epitelio [159] durante esta fase. Además, estudios realizados en el tití común han demostrado que la expresión de VEGF se centra en el estroma a partir de la cuarta semana de gestación [278]. Basándonos en estas observaciones, parece que la expresión temporal de RP en EL, EGs y estroma está implicada en la activación de los fenómenos de angiogénesis que se suceden durante la gestación temprana, y que por lo tanto, la menor presencia de este receptor en los animales tratados con prostaglandinas podría propiciar una menor activación de los fenómenos de angiogénesis a medida que avanza la gestación.

Finalmente, se incluyó en nuestro análisis la valoración inmunohistoquímica del Factor von Willebrand (vWF), por ser comúnmente utilizado como un marcador que permite identificar estructuras microvasculares en muestras histológicas [145,174]. En nuestro estudio, hemos encontrado un ligero aumento de esta molécula entre los días 15 y 21pc, lo que indicaría que existe un incremento en la densidad vascular a medida que avanza la gestación y se va desarrollando la placentación [145].

Por otra parte, el grupo tratado con análogos de prostaglandinas mostró una mayor expresión del Factor von Willebrand que el grupo sincronizado con progestágenos entre los días 15 y 21pc. Esta abundancia de vWF puede atribuirse a la maduración y envejecimiento de las estructuras vasculares neoformadas en la carúncula, ya que el incremento en su expresión ha sido asociado con estos fenómenos tras estudiar el proceso de atresia folicular [279] y el daño endotelial [145,280,281]. Este hecho, en combinación con la pérdida de positividad vascular de CD31 y VEGF, podría indicar que en los animales sincronizados con análogos de prostaglandinas existe un predominio de los procesos de maduración sobre los fenómenos de proliferación vascular en la carúncula, pudiendo interferir con la correcta formación y eficiencia de la placenta.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al valorar la evolución del proceso angiogénico durante la placentación temprana ovina, utilizando la inmunoexpresión de CD31, VEGF y vWF en el estroma caruncular, parece que existen diferencias según el tratamiento de sincronización de celo utilizado. Estas últimas podrían ser responsables de alteraciones en la placentación temprana, pudiendo afectar al posterior crecimiento y desarrollo embrionario [148,196,264].

Conclusiones

1. La concentración de progesterona plasmática en las ovejas de celo sincronizado con análogos de prostaglandinas, fue significativamente mayor durante los días 10 y 16 post-coito que la alcanzada por los animales tratados con progestágenos. Este hecho podría propiciar la preparación uterina para albergar la gestación en este grupo. El incremento significativo de esta hormona en sangre, observado en los primeros días de estudio en ambos grupos, coincide con el aumento de tamaño del cuerpo lúteo tras la ovulación.
2. La inmunoexpresión de RP fue similar en ambos grupos experimentales, disminuyendo significativamente desde el día 9 al 21 post-coito en los epitelios luminal y glandular, y aumentando o manteniéndose constante en los estromas y miometrio, lo que confirma que las células de estos compartimentos mantienen la sensibilidad a la progesterona durante la gestación temprana. RP aumentó de manera significativa en el estroma caruncular, fundamentalmente en el grupo tratado con progestágenos, hecho que demuestra la receptividad a la progesterona en el momento y lugar donde se iniciaría la adhesión embrionaria.
3. La inmunoexpresión de IFNAR fue mayor en las ovejas sincronizadas con análogos de prostaglandinas, lo que podría aumentar la sensibilidad frente al IFN- τ embrionario en este grupo de animales. La expresión de IFNAR varió de manera significativa en el epitelio luminal durante los días 9 a 21 post-coito en ambos grupos, lo que confirma su implicación en el inicio de la gestación ovina.
4. La inmunoexpresión de RE- α describió un patrón similar en los dos grupos experimentales, decreciendo desde el día 9 al día 21pc en todos los compartimentos uterinos analizados. Este hecho respalda la existencia de un mecanismo de bloqueo sobre la expresión del receptor de estrógenos durante la gestación temprana.

5. Ambos tratamientos mostraron una expresión de ROT semejante, disminuyendo de manera significativa en los compartimentos epiteliales y estromales superficiales, y manteniéndose constante en el estrato profundo. Este patrón confirma su implicación durante el establecimiento de la gestación en la especie ovina, y su bloqueo en los compartimentos superficiales para inhibir la luteolisis.
6. La observación de niveles detectables de L-Selectina y CD34 en los compartimentos epiteliales entre los días 15 y 21pc, confirma su participación en el endometrio durante la gestación temprana en la especie ovina. La falta de diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, o bien entre días de estudio, apuntaría a una presencia constitutiva de estas moléculas en las células epiteliales del útero ovino.
7. Las estructuras vasculares de la carúncula expresaron CD31 de manera semejante en ambos grupos de tratamiento. La densidad de vasos totales y capilares positivos a CD31 disminuyó de manera significativa desde el día 15 al 21pc, indicando un estímulo inicial de proliferación vascular cuando comienza a formarse la placenta, seguido de la remodelación de estos neovasos en estructuras vasculares de mayor calibre.
8. Las ovejas sincronizadas con progestágenos mostraron una densidad superior de capilares VEGF-positivos en la carúncula, lo que podría indicar un mayor estímulo de angiogénesis y de remodelación vascular durante la placentación temprana en las ovejas que recibieron este tratamiento.
9. La inmunoexpresión caruncular del Factor von Willebrand fue semejante en ambos grupos experimentales, sin mostrar diferencias significativas, lo que señalaría una tendencia hacia procesos de proliferación y remodelación vascular sobre los de maduración y/o envejecimiento vascular durante esta fase de la placentación.

10. Las diferencias encontradas a lo largo de este estudio entre ambos tratamientos de sincronización, indican una influencia similar sobre la respuesta uterina durante la gestación temprana en la especie ovina. Sin embargo, mientras que los análogos de prostaglandinas inducen una mejor preparación del útero para recibir al embrión, los progestágenos propician el intercambio metabólico placentario mediado por las carúnculas, gracias a una receptividad superior a la progesterona y un mayor desarrollo vascular a este nivel.

Bibliografia

-
- [1] Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 173-179.
 - [2] González-Bulnes A, Veiga-López A, García P, García-García RM, Ariznavarreta C, Sánchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM. (2005). Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology* 63, 2523–2534.
 - [3] Inskip E. (1973). Potential Uses of Prostaglandins in Control of Reproductive Cycles of Domestic Animals. *J. Anim. Sci.* 36, 1149-1157.
 - [4] Knights M, Hoehn T, Marsh D, Lewis P, Pate J, Dixon A, Inskip K.. Reproductive management in the ewe flock by induction or synchronization of estrus.
 - [5] Wildeus S. (1999). Current concepts in synchronization of estrus: sheeps and goats. *J. Anim. Sci. Proceedings of the american society of animal science.*
 - [6] Menegatos J, Chadío S, Kalogiannis T, Kouskoura T, Kouimtzis S. (2003). Endocrine events during the peri-estrous period and the subsequent estrous cycle in ewes after estrus synchronization. *Theriogenology* 59, 1533-1543.
 - [7] Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. (1998). Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrous ewes. *Theriogenology* 50, 377-393.
 - [8] Simonetti L, Gardón JC, Ramos G. (1999). Residual levels on medroxyprogesterone acetate (MAP)- impregnated sponges after estrus synchronization treatment in cyclic ewes. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 36 (5).
 - [9] Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. (2004). Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-246.
 - [10] Acritopoulou S, Haresign W. (1980). Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 α given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 58, 219-223.
 - [11] Beal WE. (1996). Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenology* 45, 1399-1411.
 - [12] Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. (2003). Response of the 1-5 aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47-55.
 - [13] Pope WF, Cárdenas H. (2004). Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin F2 α early in the estrous cycle. *Small. Rumin. Res.* 55, 245-248.

- [14] Letelier CA, Contreras-Solis I, García-Fernández RA, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, González-Bulnes A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandins analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 61-69.
- [15] Letelier CA, Sánchez MA, García-Fernández RA, Sánchez B, García-Palencia P, González-Bulnes A, Flores JM. (2011). Deleterious effects of progestagen treatment in VEGF expression in corpora lutea of pregnant ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 481-488.
- [16] Letelier CA, García-Fernández RA, Contreras-Solis I, Sánchez MA, García-Palencia P, Sánchez B, González-Bulnes A, Flores JM. (2010). Progestogen treatments for cycle management in a sheep model of assisted conception affect the growth patterns, the expression of luteinizing hormone receptors, and the progesterone secretion. *Fertil. Steril.* 93, 1308-1315.
- [17] García-Palencia P, Sánchez MA, Nieto A, Vilar MP, González M, Veiga-Lopez A, González-Bulnes A, Flores JM. (2007). Sex steroid receptor expression in the oviduct and uterus of sheep with estrus synchronized with progestagen or prostaglandin analogues. *Anim. Reprod. Sci.* 97, 25-35.
- [18] Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 537-550.
- [19] Spencer TE, Bazer FW. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 (49).
- [20] Guillomot M. (1995). Cellular interactions during implantation in domestic animals. *J Reprod Fertil Suppl.* 49, 39-51.
- [21] Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. (2004). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128, 657-668.
- [22] Kimber SJ, Spanswick C. (2000). Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 77-92.
- [23] Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Bazer FW. (1999). Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biol. Reprod.* 61 (4), 884-891.
- [24] Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Pfarrer C, Spencer TE, Burghardt RC. (2001). Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol. Reprod.* 65, 820-828.

- [25] Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, Spencer TE, Bazer FW, Pfarrer C, Gray CA. (2003). Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biol. Reprod.* 68 (6), 1951-1958.
- [26] Spencer TE, Bartol FF, Bazer FW, Johnson GA, Joyce MM. (1999). Identification and characterization of Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1-like protein expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 60, 241-250.
- [27] Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ. (2003). Trophoblast L-Selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 299, 405-408.
- [28] Muniz JJ, Joyce MM, Taylor II JD, Burghardt JR, Burghardt RC, Johnson GA. (2006). Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1-like protein and L-selectin expression in sheep interplacentomal and placentomal endometrium. *Reproduction* 131, 751-761.
- [29] Margarit L, Gonzalez D, Lewis PD, Hopkins L, Davies C, Conlan RS, Joels L, White JO. (2009). L-Selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects. *Hum. Reprod.* 24 (11), 2767-2777.
- [30] Grazul-Bilska AT, Borowicz PP, Johnson ML, Minten M, Bilski JJ, Wroblewski R, Redmer DA, Reynolds LP. (2010). Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140, 165-174.
- [31] Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Borowicz PP, Minten M, Bilski JJ, Wroblewski R, Velimirovich M, Coupe LR, Redmer DA, Reynolds LP. (2011). Placental development during early pregnancy in sheep: cell proliferation, global methylation, and angiogenesis in the fetal placenta. *Reproduction* 141, 529-540.
- [32] Rosa HJD, Bryant MJ. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155-171.
- [33] Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699-715.
- [34] Driancourt MA. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- [35] Evans ACO. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 289-306.
- [36] Hansel W, Convey EM. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 (2), 404-424.

- [37] Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition. Chapter 7, 144-163.
- [38] Couse JF, Hewitt SC, Korach KS. (2006). Knobil and Neill's physiology of reproduction. Third edition. Chapter 15, 593-678.
- [39] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews* 80 (1), 1-29.
- [40] Gonzalez-Bulnes A, Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. (2004). Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 107-119.
- [41] McNatty KP, Gibb M, Dobson C, Thurley DC. (1981). Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J. Endocr.* 90, 375-389.
- [42] Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ. (1999). Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 117, 355-367.
- [43] Baird DT. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 18, 359-364.
- [44] Baird DT, Swanson IA, McNeilly AS. (1981). Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol. Reprod.* 24, 1013-1025.
- [45] Mahesh VB, Brann DW. (1998). Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63, 616-629.
- [46] Duggavathi R, Bartlewski PM, Barret DMW, Rawlings NC. (2005). The temporal relationship between patterns of LH and FSH secretion, and development of ovulatory-sized follicles during the mid- to late-luteal phase of sheep. *Theriogenology* 64, 393-407.
- [47] Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition. Chapter 8, 164-187.
- [48] Murphy BD. (2000). Models of luteinization. *Biology of reproduction* 63, 2-11.
- [49] Weems C.W., Weems Y.S. and Randel R.D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet. J.* 171(2), 206-228.

- [50] Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 65-80.
- [51] Niswender GD. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* 123, 333-339.
- [52] Martin GB, Price CA, Thiéry J-C, Webb R. (1988). Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 82, 319-328.
- [53] Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition. Chapter 9, 188-213.
- [54] Nett TM, McClellan MC, Niswender GD. (1976). Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol. Reprod.* 15, 66-78.
- [55] Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. (1994). Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50, 239-247.
- [56] Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition. Chapter 2, 10-43.
- [57] Spencer TE, Bazer FW (1995). Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression during the Estrus Cycle and Early Pregnancy in the Ewe. *Biol. Reprod.* 53, 1527-1543.
- [58] Murray MK. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol. Reprod.* 53, 653-663.
- [59] Spencer TE, Bazer FW. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front. Biosci.* 7, 1879-1898.
- [60] Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol. Reprod.* 69, 1458-1471.
- [61] Satterfield MC, Song G, Kochan KJ, Riggs PK, Simmons RM, Elsik CG, Adelson DL, Bazer FW, Zhou H, Spencer TE. (2009). Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation. *Physiol. Genomics.* 39, 85-99.
- [62] Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. (2004). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.* 71, 2-10.

- [63] Cherny RA, Salamonsen LA, Findlay JK. (1991). Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 321-331.
- [64] Wathes DC, Hamon M. (1993). Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy on the ewe. *J. Endocrinol.* 138, 479-491.
- [65] Ing NH, Zhang Y. (2004). Cell-specific expression of estrogen-responsive genes in the uteri of cyclic, early pregnant, and ovariectomized ewes. *Theriogenology* 62, 403-414.
- [66] Cheon Y-P, Li Q, Xu X, DeMayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. (2002). A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Mol. Endocrinol.* 16, 2853-2871.
- [67] Ashley RL, Arreguin-Arevalo JA, Nett TM. (2009). Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7 (42).
- [68] Ing NH, Tornesi MB. (1997). Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol. Reprod.* 56, 1205-1215.
- [69] Hansen PJ. (1998). Regulation of uterine immune function by progesterone-lessons from the sheep. *J. Reprod. Immunol.* 40, 63-79.
- [70] Satterfield MC, Hayashi K, Song G, Black SG, Bazer FW, Spencer TE. (2008). Progesterone Regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the Endometrium of the Ovine Uterus. *Biol. Reprod.* 79, 1226-1236.
- [71] Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 138, 195-209.
- [72] Rosenfeld CS, Yuan X, Manikkam M, Calder MD, Garverick HA, Lubahn DB. (1999). Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor- β within the ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 60, 691-697.
- [73] Cárdenas H, Burke KA, Bigsby RM, Pope WF, Nephew KP. (2001). Estrogen receptor β in the sheep ovary during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 65, 128-134.
- [74] Ing NH, Spencer TE, Bazer FW. (1996). Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. *Biol. Reprod.* 54, 591-599.

- [75] Ing NH, Ott TL. (1999). Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol. Reprod.* 60, 134-139.
- [76] Gimpl G, Fahrenholz F (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629-83.
- [77] Flint AP, Riley PR, Kaluz S, Stewart HJ, Abayasekara DR. (1995). The sheep endometrial oxytocin receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395, 281-294.
- [78] Riley PR, Flint AP, Abayasekara DR, Stewart HJ. (1995). Structure and expression of an ovine endometrial oxytocin receptor cDNA. *J. Mol. Endocrinol.* 15 (2), 195-202.
- [79] Kinsey CG, Bussolati G, Bosco M, Kimura T, Pizzorno MC, Chernin MI, Cassoni P, Novak JF. (2007). Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor. *J. Cell. Mol. Med.* 11 (1), 96-110.
- [80] Zingg HH, Grazzini E, Breton C, Larcher A, Rozen F, Russo C, Guillon G, Mouillac B. (1998). Genomic and non-genomic mechanisms of oxytocin receptor regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449, 287-295.
- [81] Fleming JG, Spencer TE, Safe SH, Bazer FW. (2006). Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. *Endocrinology* 147, 899-911.
- [82] Flint APF, Sheldrick EL. (1983). Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. *Reprod. Fert.* 67, 215-225.
- [83] Stormshak F. (2003). Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (92).
- [84] Silvia WJ, Raw RE. (1993). Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the ovine uterus by ovarian steroids. *J. Reprod. Fertil.* 98 (2), 341-347.
- [85] Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW. (1995). Ovine interferon-tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biol. Reprod.* 53, 732-745.
- [86] Spencer TE, Becker W, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW (1995). Ovine Interferon Tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 136, 4932-4944.
- [87] Goding JR. (1974). The demonstration that PGF $_{2\alpha}$ is the uterine luteolysin in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 38 (2), 261-271.

- [88] McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC. (1984). Hormone receptor control of pulsatile secretion of $\text{PGF}_{2\alpha}$ from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 7 (1), 31-55.
- [89] Zarco L, Stabenfeldt GH, Quirke JF, Kindahl H, Bradford GE. (1988). Release of prostaglandin $\text{F-2}\alpha$ and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. *Reprod. Fert.* 83, 517-526.
- [90] Ford SP, Weems CW, Pitts RE, Pexton JE, Butcher RL, Inskeep EK. (1975). Effects of estradiol- 17β and progesterone on prostaglandins F in sheep uteri and uterine venous plasma. *J. Anim. Sci.* 41 (5), 1407-1413.
- [91] Zarco L, Stabenfeldt GH, Basu S, Bradford GE, Kindahl H. (1988). Modification of prostaglandin $\text{F-2}\alpha$ synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 83, 527-536.
- [92] Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson Jr L. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin $\text{F2}\alpha$ during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 45, 655-663.
- [93] Beard AP, Lamming GE. (1994). Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced $\text{PGF}_{2\alpha}$ release in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 100, 469-475.
- [94] Kim S, Choi Y, Spencer TE, Bazer FW. (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (58).
- [95] Charpigny G, Reinaud P, Tamby J-P, Créminon C, Martal J, Maclouf J, Guillomot M. (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology.* 138 (5), 2163-2171.
- [96] Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. (2011). Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biol. Reprod.* 84 (6), 1119-1127.
- [97] Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. (2008). Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semen. Cell. Dev. Biol.* 19 (2), 170-177.
- [98] Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. (2002). Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs.* 172 (3), 202-217.
- [99] Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. (2001). Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod.* 64 (6), 1608-1613.

- [100] Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. (2002). Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 124 (2), 289-300.
- [101] Roberts R, Xie S, Mathialagan N. (1996). Maternal Recognition of Pregnancy. *Biol. Reprod.* 54, 294-302.
- [102] Godkin JD, Bazer FW, Roberts RM. (1984). Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology* 114 (1), 120-130.
- [103] Godkin JD, Bazer FW, Thatcher WW, Roberts RM. (1984). Proteins released by cultured Day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J. Reprod. Fertil.* 71 (1), 57-64.
- [104] Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM. (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. *Nature*. 330, 377-379.
- [105] Salamonsen LA, Stuchbery SJ, O'Grady CM, Godkin JD, Findlay JK. (1988). Interferon- α mimics effects of ovine trophoblast protein 1 on prostaglandin and protein secretion by ovine endometrial cells in vitro. *J. Endocrinol.* 117 (1), R1-R4.
- [106] Ealy AD, Yang QE. (2009). Control of Interferon-Tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am. J. Reprod. Immunol.* 61 (2), 95-106.
- [107] Ashworth CJ, Bazer FW. (1989). Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol. Reprod.* 40, 425-433.
- [108] Nephew KP, McClure KE, Ott TL, Dubois DH, Bazer FW, Pope WF. (1991). Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. *Biol. Reprod.* 44, 536-539.
- [109] Han C-S, Mathialagan N, Klemann S, Roberts RM. (1997). Molecular Cloning of Ovine and Bovine Type I Interferon Receptor Subunits from Uteri, and Endometrial Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Ovine Receptors During the Estrous Cycle and Pregnancy. *Endocrinology* 138, 4757-4767.
- [110] Rosenfeld C, Han C-S, Alexenko A, Spencer TE. (2002). Expression of Interferon Receptor Subunits, IFNAR 1 and IFNAR 2, in the Ovine Uterus. *Biol. Reprod.* 67, 847-853.
- [111] Imakawa K, Tamura K, Lee R, Ji Y, Kogo H, Sakai S, Christenson R. (2002). Temporal expression of type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN α can bind to this receptor. *Endocr. J.* 49 (2), 195-205.

- [112] Spencer TE, Sandra O, Wolf E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* 135 (2), 165-179.
- [113] Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signalling pathways. *Reprod. Biol.* 8, 179-211.
- [114] Chen Y, Antoniou E, Liu Z, Hearne LB, Roberts RM. (2007). A microarray analysis for genes regulated by interferon- τ in ovine luminal epithelial cells. *Reproduction* 134, 123-135.
- [115] Choi Y, Johnson GA, Burghardt RC, Berghman LR, Joyce MM, Taylor KM, Stewart MD, Bazer FW, Spencer TE. (2001). Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium to the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 65 (4), 1038-1049.
- [116] Fleming JA, Song G, Choi Y, Spencer TE, Bazer FW. (2009). Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is expressed in the ovine uterus and functions as a transcriptional activator. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2), 252-260.
- [117] Aplin JD. (1997). Adhesion molecules in implantation. *Rev. Reprod.* 2 (2), 84-93.
- [118] Dominguez F, Yáñez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Simón C. (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *Faseb. J.* 19 (9), 1056-1060.
- [119] Singh H, Aplin JD. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J. Anat.* 215 (1): 3-13.
- [120] Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, Yuan L, Beyler SA, Lessey BA. (2000). Blockade of the alpha (v) beta (3) integrin adversely affects implantation in the Mouse. *Biol. Reprod.* 62 (5), 1285-1290.
- [121] Illera MJ, Lorenzo PL, Gui YT, Beyler SA, Apparao KB, Lessey BA. (2003). A role for alphavbeta3 integrin during implantation in the rabbit model. *Biol. Reprod.* 68 (3), 766-771.
- [122] Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. (1996). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. *Biol. Reprod.* 55 (5), 1098-1106.
- [123] Bowen JA, Bazer FW, Burghardt RC. (1997). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vitro. *Biol. Reprod.* 56 (2), 409-415.

- [124] Burghardt RC, Bowen JA, Newton GR, Bazer FW. (1997). Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 151-164.
- [125] Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. (1999). Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biol. Reprod.* 61 (4), 892-899.
- [126] Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RC, Taylor KM, Gray CA, Bazer FW. (2000). Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 62 (5), 1315-1321.
- [127] Lewis SK, Farmer JL, Burghardt RC, Newton GR, Johnson GA, Adelson DL, Bazer FW, Spencer TE. (2007). Galectin 15 (LGALS15): a gene uniquely expressed in the uteri of sheep and goats that functions in trophoblast attachment. *Biol. Reprod.* 77 (6), 1027-1036.
- [128] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50 (2), 197-263.
- [129] Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA Jr, Tender TF. (1991). Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 147 (8), 2565-2573.
- [130] Arbonés ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1 (4), 247-260.
- [131] Lawrence MB, Bainton DF, Springer TA. (1994). Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-Selectin. *Immunity.* 1 (2), 137-145.
- [132] Rosen SD. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 129-156.
- [133] Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillet N, Watson SR, Rosen SD. (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule.
- [134] Rosen SD. (1993). Ligands for L-selectin: where and how many? *Res. Immunol.* 144 (9), 699-703.

- [135] Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. (1994). Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*. 84 (8), 2554-2565.
- [136] Varki A. (1997). Selectin ligands: will the real ones please stand up?. *J. Clin. Invest.* 99 (2), 158-162.
- [137] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 114 (6), 744-754.
- [138] Lai T-H, Zhao Y, Shih I-M, Ho C-L, Bankowski B, Vlahos N. (2006). Expression of L-selectin ligands in human endometrium during the implantation window after controlled ovarian stimulation for oocyte donation. *Fertil. Steril.* 85, 761-763.
- [139] Palomino WA, Kohen P, Devoto L. (2010). A single midcycle dose of levonorgestrel similar to emergency contraceptive does not alter the expression of the L-selectin ligand or molecular markers of endometrial receptivity. *Fertil. Steril.* 94 (5), 1589-1594.
- [140] Liu S, Yang X, Liu Y, Wang X, Yan Q. (2011). sLeX/L-selectin mediates adhesion in vitro implantation model. *Mol. Cell. Biochem.* 350 (1-2), 185-192.
- [141] Aplin JD, Kimber SJ. (2004). Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 (48).
- [142] Igwebuike UM. (2009). A Review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 112, 1-7.
- [143] Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA. (2005). Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26 (10), 689-708.
- [144] Osol G, Mandala M. (2009). Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Physiology* 24, 58-71.
- [145] Reynolds LP, Redmer DA. (1992). Growth and Microvascular Development of the Uterus during Early Pregnancy in Ewes. *Biol. Reprod.* 47, 698-708.
- [146] Reynolds LP, Magness RR, Ford SP. (1984). Uterine blood flow during early pregnancy in ewes: interaction between the conceptus and the ovary bearing the corpus luteum. *J. Anim. Sci.* 58, 423-429.
- [147] Reynolds LP, Redmer DA. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73, 1839-1851.

- [148] Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G, Spencer TE. (2006). Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J. Physiol.* 572, 51-58.
- [149] Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ. (2009). Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 71, 1298-1306.
- [150] Reynolds LP, Redmer DA. (2001). Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.* 64 (4), 1033-1040.
- [151] Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Caton JS. (2005). Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J. Physiol.* 565, 43-58.
- [152] Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.* 47, 149-161.
- [153] Ramjaun AR, Hodivala-Dilke K. (2009). The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41, 521-530.
- [154] Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997). The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr. Rev.* 18 (1), 4-25.
- [155] Mehta D, Malik AB. (2006). Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol. Rev.* 86, 279-367.
- [156] Kaczmarek MM, Blitek A, Kaminska K, Bodek G, Zygmunt M, Schams D, Ziecik AJ. (2008). Assessment of VEGF-receptor system expression in the porcine endometrial stromal cells in response to insulin-like growth factor-I, relaxin, oxytocin and prostaglandin E₂. *Mol. Cell. Endocrinol.* 291 (1-2), 33-41.
- [157] Manisha B, Dhasmana D, Bist S. (2010). Angiogenesis: Future of pharmacological modulation. *Indian J. Pharmacol.* 42 (1), 2-8.
- [158] Sagsöz H, Saruhan BG. (2011). The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids. *Theriogenology* 75, 1720-1734.
- [159] Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 123, 379-387.

- [160] Huppertz B, Peeters LLH. (2005). Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis* 8, 156-167.
- [161] Rabbani ML-M, Rogers PAW. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122, 85-90.
- [162] Rockwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD. (2002). Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Action Blocks Estrogen-Induced Uterine Edema and Implantation in Rodents. *Biol. Reprod.* 67, 1804-1810.
- [163] Douglas NC, Tang H, Gomez R, Pytowski B, Hicklin DJ, Sauer CM, Kitajewski J, Sauer MV, Zimmermann RC. (2009). Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinology*. 150, 3845-3854.
- [164] Charnock-Jones DS, Clark DE, Licence D, Day K, Wooding FB, Smith SK. (2001). Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction* 122 (5), 753-760.
- [165] Vonnahme KA, Wilson ME, Ford SP. (2001). Relationship Between Placental Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Placental/Endometrial Vascularity in the Pig. *Biol. Reprod.* 64, 1821-1825.
- [166] Wollenhaupt K, Welter H, Einspanier R, Manabe N, Brüssow KP. (2004). Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGF-R) and Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF-R) Systems in Porcine Oviduct and Endometrium during the Time of Implantation. *J. Reprod. Dev.* 50, 269-278.
- [167] Kaczmarek MM, Wacławik A, Blitek A, Kowalczyk AE, Schams D, Ziecik AJ. (2008). Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor System in the Porcine Endometrium Throughout the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 362-372.
- [168] Pfarrer CD, Ruziwa SD, Winther H, Callesen H, Leiser R, Schams D, Dantzer V. (2006). Localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in Bovine Placentomes from Implantation Until Term. *Placenta* 27, 889-898.
- [169] Ferrer L, Fondevila D, Rabanal RM, Vilafranca M. (1995). Immunohistochemical Detection of CD31 Antigen in Normal and Neoplastic Canine Endothelial Cells. *J. Comp. Path.* 112, 319-326.

-
- [170] DeLisser HM, Baldwin HS, Albelda SM. (1997). Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31): A Multifunctional Vascular Cell Adhesion Molecule. *Trends Cardiovasc. Med.* 7, 203-210.
- [171] Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisser HM. (2002). Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282, 1181-1190.
- [172] Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. (2004). Angiogenesis and microvascular development in the marmoset (*Callithrix jacchus*) endometrium during early pregnancy. *Reproduction* 128, 107-116.
- [173] Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340, 1120-1124.
- [174] Weidner N. (1995). Intratumor Microvessel Density as a Prognostic Factor in Cancer. *Am. J. Pathol.* 147, 9-19.
- [175] Lyall F, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A, Robson SC. (2001). Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation. The Role of PECAM-1 in Normal Pregnancy, Preeclampsia, and Fetal Growth Restriction. *Am. J. Pathol.* 158, 1713-1721.
- [176] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, Gatter KC. (1997). Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer. Res.* 3, 2485-2492.
- [177] Augustin HG. (1998). Antiangiogenic tumor therapy: will it work? *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 216-222.
- [178] Woolf AD, Warkeley G, Wallington TB, Scott DG, Dieppe PA. (1987). Factor VIII related antigen in the assessment of vasculitis. *Annals Rheumatic Dis.* 46, 441-447.
- [179] Bowyer SL, Ragsdale CG, Sullivan DB. (1989). Factor VIII related antigen and childhood rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 16, 1093-1097.
- [180] Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG. (1996). Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab. Invest.* 74, 771-780.
- [181] Hervé MAJ, Meduri G, Petit FG, Domet TS, Lazennec G, Mourah S, Perrot-Appianat M. (2006). Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J. Endocrinol.* 188, 91-99.

- [182] Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. (1993). Patterns of Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptors in Mice Suggest a Role in Hormonally Regulated Angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 91, 2235-2243.
- [183] Rahman AN, Snibson KJ, Lee CS, Meeusen EN. (2004). Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium. *J. Reprod. Immunol.* 64, 45-58.
- [184] Reisinger K, Baal N, McKinnon T, Münstedt K, Zygmunt M. (2007). The gonadotropins: Tissue-specific angiogenic factors? *Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 65-80.
- [185] Chang K, Zhang L. (2008). Steroid Hormones and Uterine Vascular Adaptation to Pregnancy. *Reprod. Sci.* 15, 336-348.
- [186] Macpherson AM, Archer DF, Leslie S, Charnock-Jones DS, Makkink WK, Smith SK. (1999). The effect of etonogestrel on VEGF, oestrogen and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell number in human endometrium. *Hum. Reprod.* 14, 3080-3087.
- [187] Hickey M, Pillai G, Higham JM, Sullivan M, Horncastle D, Doherty D, Stamp G. (2003). Changes in endometrial blood vessels in the endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding. *Hum. Reprod.* 18, 1100-1106.
- [188] Jondet M, Vacher-Lavenu MC, Chapron C. (2006). Image analysis measurements of the microvascularisation in endometrium, superficial and deep endometriotic tissues. *Angiogenesis* 9, 177-182.
- [189] Okada H, Okamoto R, Tsuzuki T, Tsuji S, Yasuda K, Kanzaki H. (2011). Progestins inhibit estradiol-induced vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor 1 in human endometrial stromal cells. *Fertil. Steril.* 96, 786-791.
- [190] Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. (2006). Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F_{2α}-induced regression in sheep. *Reproduction* 131, 1115-1126.
- [191] Sherer DM, Abulafia O. (2001). Angiogenesis during Implantation, and Placental and Early Development. *Placenta* 22, 1-13.
- [192] Barry JS, Anthony RV. (2008). The Pregnant Sheep as a Model for Human Pregnancy. *Theriogenology* 69 (1), 55-67.

- [193] Ma Y, Zhu MJ, Zhang L, Hein SM, Nathanielsz PW, Ford SP. (2010). Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonary vascularity and angiogenic factor expression in the ewe. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, 249-258.
- [194] Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Reprod. Biol.* 110, 10-18.
- [195] Millaway DS, Redmer DA, Kirsch JD, Anthony RV, Reynolds LP. (1989). Angiogenic activity of maternal and fetal placental tissues of ewes throughout gestation. *J. Reprod. Fertil.* 86 (2), 689-696.
- [196] Hafez SA, Borowicz P, Reynolds LP, Redmer DA. (2010). Maternal and fetal microvascular in sheep placenta at several stages of gestation. *J. Anat.* 216, 292-300.
- [197] Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 131-143.
- [198] Thatcher W, Staples C, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt E. (1994). Embryo Health and Mortality in Sheep and Cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 16-30.
- [199] Pope WF. (1988). Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol. Reprod.* 39 (5), 999-1003.
- [200] Wilmut I, Sales DI, Ashworth CJ. (1986). Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J. Reprod. Fertil.* 76 (2), 851-864.
- [201] Lawson RAS, Parr RA, Cahill LP. (1983). Evidence for maternal control of blastocyst growth after asynchronous transfer of embryos to the uterus of the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 67, 477-483.
- [202] Mann GE, Lamming GE. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction.* 121 (1), 175-180.
- [203] Nogueira MF, Melo DS, Carvalho LM, Fuck EJ, Trinca LA, Barros CM. (2004). Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2alpha and eCG? *Theriogenology* 61 (7-8), 1283-1290.
- [204] Green MP, Hunter MG, Mann GE. (2005). Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 88 (3-4), 179-189.
- [205] Clemente M, de la Fuente J, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect

- of the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138, 507-517.
- [206] Mann GE, Lamming GE. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 269-274.
- [207] Larson SF, Butler WR, Currie WB. (1997). Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 80 (7), 1288-1295.
- [208] Larson SF, Butler WR, Currie WB. (2007). Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 102 (1-2), 172-179.
- [209] Kleeman DO, Walker SK, Seamark RF. (1994). Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 102 (2), 411-417.
- [210] Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE. (2006). Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* 75, 289-296.
- [211] Howard JM, Manzo R, Dalton JC, Frago F, Ahmadzadeh A. (2006). Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 95 (3-4), 224-233.
- [212] Bazer FW, Spencer TE. (2005). Reproductive biology in the era of genomics biology. *Theriogenology* 64, 442-456.
- [213] Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. (2011). Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 27 (1), 67-69.
- [214] Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. (1998). Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. *Theriogenology* 50 (3), 377-393.
- [215] Daniel JA, Sterle SW, McFadin-Buff EL, Keisler DH. (2001). Breeding ewes out of season using melengestrol acetate, one injection of progesterone, or a controlled internal drug releasing device. *Theriogenology* 56, 105-110.
- [216] Robinson TJ. (1964). Synchronization of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges.
- [217] Ainsworth I, Wolynetz MS. (1982). Synchronization of estrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by

- subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. *J. Anim. Sci.* 54 (6), 1120-1127.
- [218] Simonetti L, Blanco MR, Gardón JC. (2000). Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small. Rumin. Res.* 38, 243-247.
- [219] Evans AC, Duffy P, Crosby TF, Hawken PA, Boland MP, Beard AP. (2004). Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronization and fertility during the breeding season in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 84 (3-4), 349-358.
- [220] Hawken PAR, Beard AP, Esmaili T, Kadokawa H, Evans ACO, Blache D, Martin GB. (2007). The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology* 68, 56-66.
- [221] Knights M, Maze TD, Bridges PJ, Lewis PE, Inskeep EK. (2001). Short-term treatment with a controlled internal drug releasing (CIDR) device and FSH to induce fertile estrus and increase prolificacy in anestrus ewes. *Theriogenology* 55, 1181-1191.
- [222] Boscós CM, Samartzi FC, Dellis S, Rogge A, Stefanakis A, Krambovitis E. (2002). Use of progestagen-gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology* 58, 1261-1272.
- [223] Barret DMW, Bartlewski PM, Batista-Arteaga M, Symington A, Rawling NC. (2004). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12-day treatment with progestogen releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology* 61 (2-3), 311-327.
- [224] Galbraith H. (2002). Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues. *Nutr. Res. Rev.* 15, 293-314.
- [225] Scaramuzzi RJ, Downing JA, Campbell BK, Cognie Y. (1988). Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 41 (1), 37-45.
- [226] Robinson TJ, Quinlivan TD, Baxter C. (1968). The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 17, 471-483.
- [227] Killian DB, Kiesling DO, Warren JE Jr. (1985). Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anestrus ewes. *J. Anim. Sci.* 61 (1), 210-215.
- [228] Berlinguer F, Gonzalez-Bulnes A, Succu S, Leoni G, Mossa F, Bebbere D, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Veiga-Lopez A, Naitana S. (2007). Effects of

- progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32 (4), 303-314.
- [229] Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. (2001). Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993-1004.
- [230] Evans ACO, Flynn JD, Quinn KM, Duffy P, Quinn P, Madgwick S, Crosby TF, Boland MP, Beard AP. (2001). Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14-day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. *Theriogenology* 56, 923-936.
- [231] Hawk HW, Cooper BS. (1977). Sperm transport into the cervix of the ewe after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci.* 44 (4), 638-644.
- [232] Covaco-Gonçalves S, Marques CC, Horta AEM, Figueroa JP. (2006). Increased cervical electrical activity during oestrus in progestagen treated ewes: possible role in sperm transport. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 360-365.
- [233] Acritopoulou S, Haresign W, Lamming GE. (1978). Time of ovulation in ewes after treatment with a prostaglandin F-2 α analogue. *J. Reprod. Fert.* 54, 189-191.
- [234] Fierro S, Olivera-Muzante J, Gil J, Viñoles C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology* 76, 630-639.
- [235] Olivera-Muzante J, Gil J, Fierro S, Menchaca A, Rubianes E. (2011). Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 76, 1501-1507.
- [236] Menchaca A, Miller V, Gil J, Pinczak A, Laca M, Rubianes E. (2004). Prostaglandin F2 α treatment associated with timed artificial insemination in ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 39, 352-355.
- [237] Liu X, Dai Q, Hart EJ, Duggavathi R, Barret DMW, Rawlings NC, Bartlewski PM. (2006). Ovarian and endocrine responses to prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) given at the expected time of the endogenous FSH peak at mid-cycle in ewes. *Theriogenology* 66, 811-821.
- [238] Barrett DMW, Bartlewski PM, Cook SJ, Rawlings NC. (2002). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF_{2 α} given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409-1424.
- [239] Olivera-Muzante J, Fierro S, López V, Gil J. (2011). Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 75, 1232-1238.

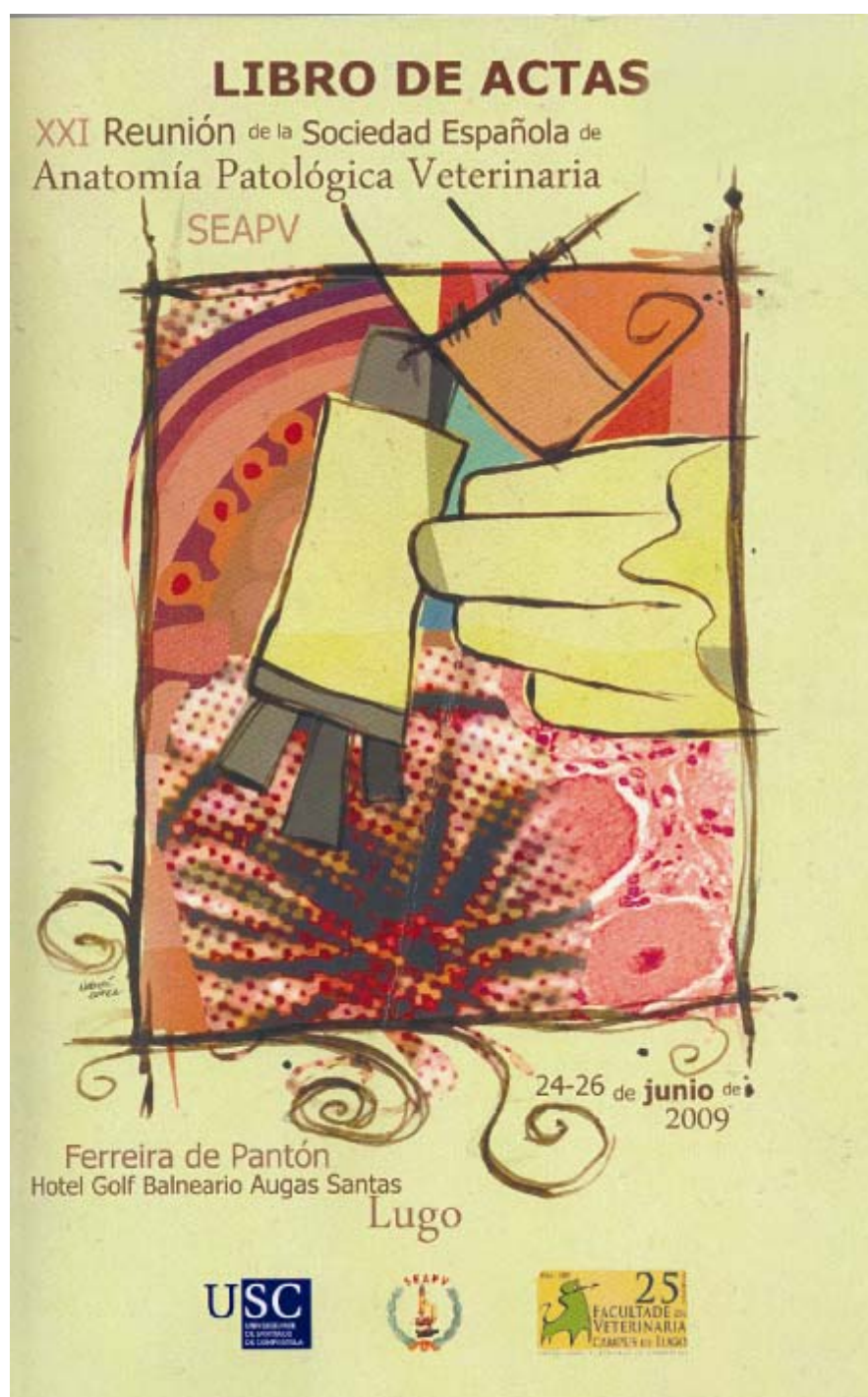
- [240] Hawk HW, Cooper BS, Pursel VG. (1981). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrus with prostaglandin or progestogen. *J. Anim. Sci.* 52 (3), 601-610.
- [241] Uribe-Velásquez LF, Oba E, Souza MIL. (2008). Población folicular y concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Arch. Med. Vet.* 40, 83-88.
- [242] Schiewe MC, Howard JC, Goodrowe KL, Stuart LD, Wildt DE. (1990). Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F $_{2\alpha}$ synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology* 34 (3), 469-486.
- [243] Hawk HW. (1973). Uterine motility and sperm transport in the estrous ewe after prostaglandin induced regression of corpora lutea. *J. Anim. Sci.* 37 (6), 1380-1385.
- [244] Young SL, Lessey BA. (2010). Progesterone function in human endometrium: clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* 28 (1), 5-16.
- [245] Woody CO, First NL, Pope AL. (1967). Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. *J. Anim. Sci.* 26 (1), 139-141.
- [246] Vallet JL, Lamming GE, Batten M. (1990). Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 90, 625-634.
- [247] Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 135-152.
- [248] Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction* 140, 143-153.
- [249] Yamaguchi H, Nagaoka K, Matsuda F, Xu N, Christenson RK, Imakawa K, Sakai S. (2001). Regulation of Interferon- τ gene expression and the maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Dev.* 47 (2), 69-82.
- [250] Lamming GE, Wathes DC, Flint AP, Payne JH, Stevenson KR, Vallet JL. (1995). Local action of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J. Reprod. Fert.* 105 (1), 165-175.

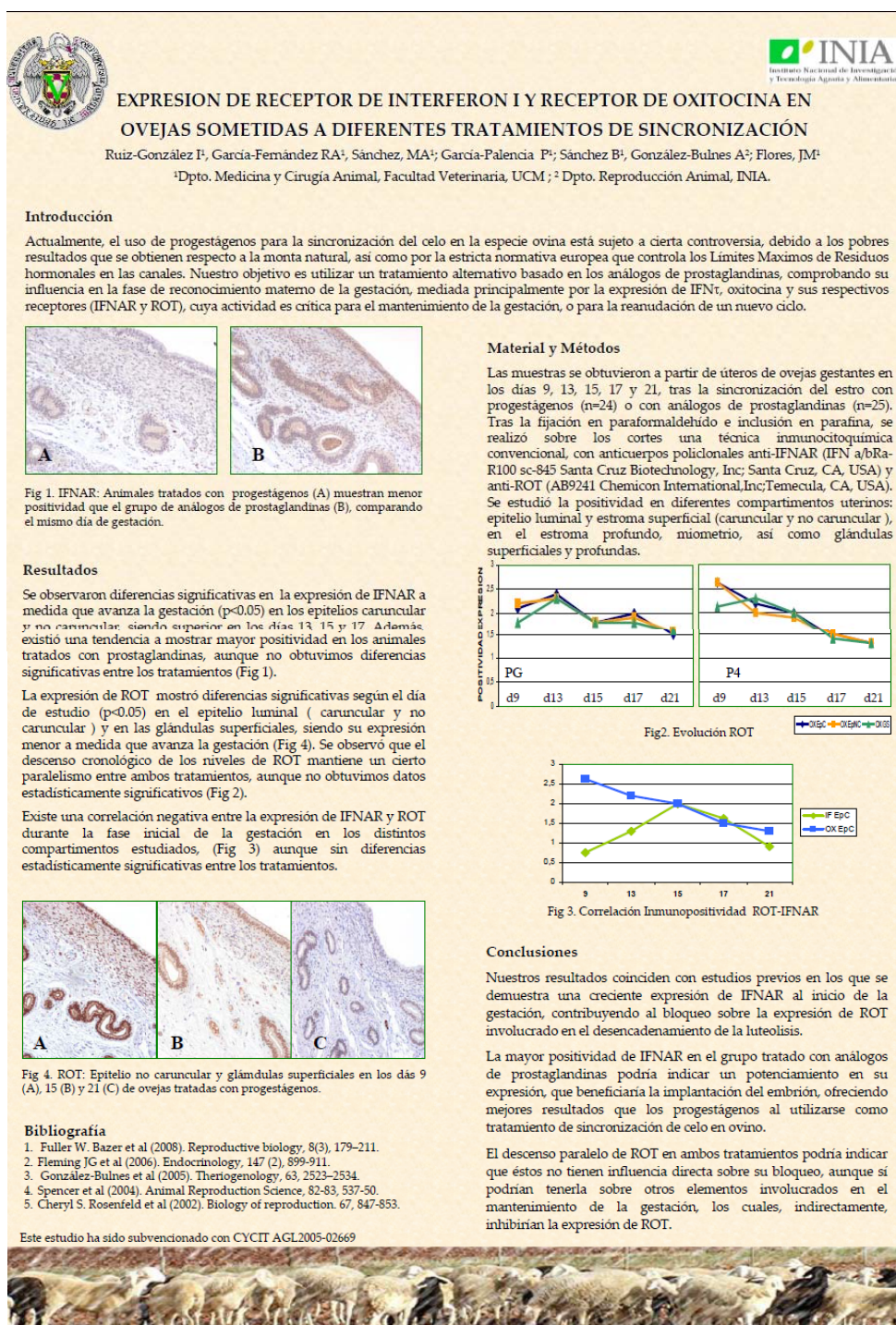
- [251] Zheng J, Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. (1996). Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy. *Endocrinology* 137 (1), 340-348.
- [252] Cherny RA, Salamonsen LA, Findlay JK. (1991). Immunocytochemical localization of oestrogen receptors in the endometrium of the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 321-331.
- [253] Stevenson KR, Riley PR, Stewart HJ, Flint AP, Wathes DC. (1994). Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during oestrus cycle and early pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 12 (1), 93-105.
- [254] Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47 (3), 703-714.
- [255] Roberts RM (2007). Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 403-408.
- [256] Banu SK, Lee J, Stephen SD, Nithy TK, Arosh JA (2010). Interferon Tau Regulates PGF2{alpha} Release from the Ovine Endometrial Epithelial Cells via Activation of Novel JAK/EGFR/ERK/EGR-1 Pathways. *Mol. Endocrinol.* 24, 2315-2330.
- [257] Imakawa K, Chang KT, Christenson RK. (2004). Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *J. Reprod. Dev.* 50 (2), 155-169.
- [258] Bowen JA, Burghardt RC. (2000). Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11 (2), 93-104.
- [259] Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO, Korzeniowski P, Sun J, Chwalisz K. (1996). Endometrial progesterone receptor and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil. Steril.* 65 (3), 477-483.
- [260] Lee KY, DeMayo FJ. (2004). Animal models of implantation. *Reproduction.* 128 (6), 679-695.
- [261] Wooding FB. (1984). Role of bibucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am. J. Anat.* 170 (2), 233-250.
- [262] Spencer TE, Stagg AG, Joyce MM, Jenster G, Wood CG, Bazer FW, Wiley AA, Bartol FF. (1999). Discovery and characterization of endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. *Endocrinology* 140 (9), 4070-4080.

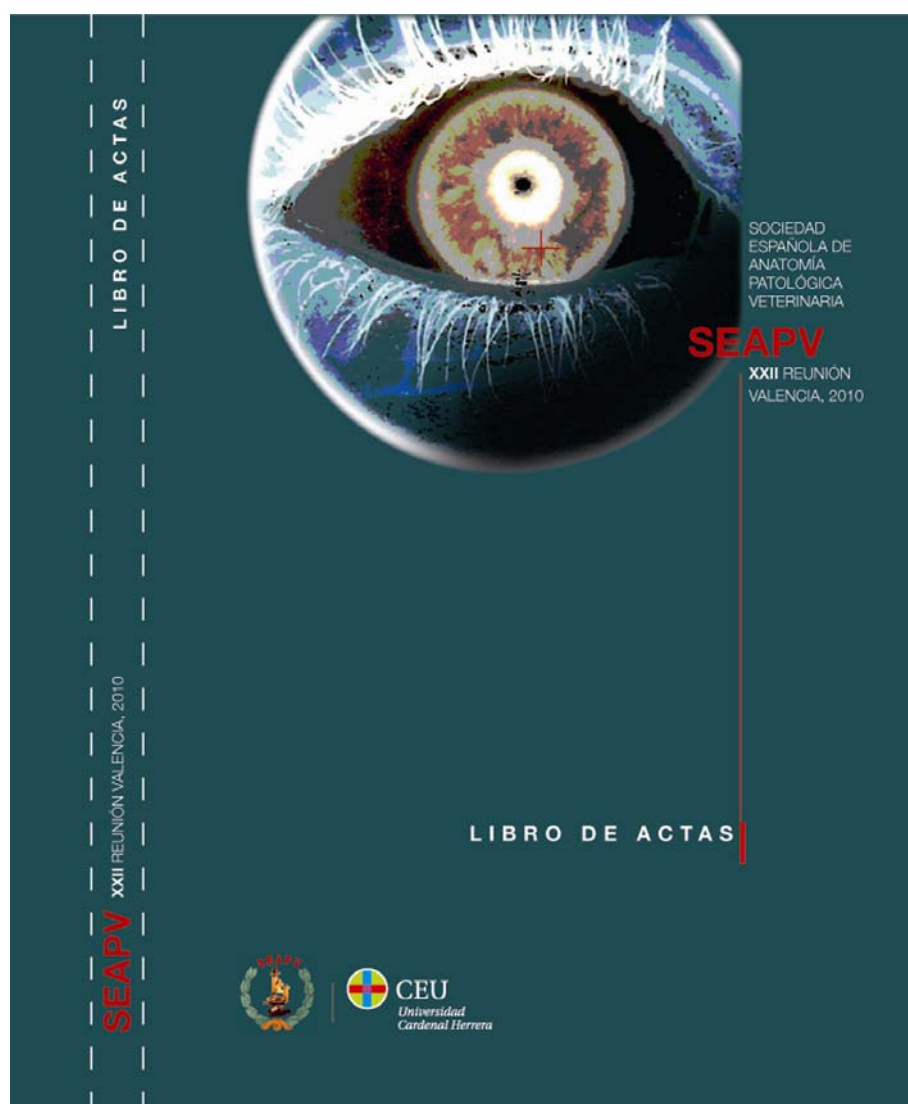
-
- [263] Wang B, Sheng J-Z, He R-H, Qian Y-L, Jin F, Huang H-F. (2008). High expression of L-Selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60 (2), 127-134.
- [264] Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, Hafez SA, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. (2010). Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 355-365.
- [265] Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L, Dhara S, Smith SK, Sengupta J. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol. Hum. Reprod.* 6 (10), 935-941.
- [266] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
- [267] Bogic LjV, Brace RA, Cheung CY. (2001). Cellular Localization of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovine Placenta and Fetal Membranes. *Placenta* 21, 203-209.
- [268] Hoefer IE, Piek JJ, Pasterkamp G. (2006). Pharmaceutical Interventions to Influence Arteriogenesis: New Concepts to Treat Ischemic Heart Disease. *Curr. Med. Chem.* 13, 979-987.
- [269] Chakraborty I, Das SK, Dey SK. (1995). Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J. Endocrinol.* 147, 339-352.
- [270] Yi XJ, Jiang HY, Lee KK, O WS, Tang PL, Chow PH. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell. Tissue Res.* 296, 339-349.
- [271] Hyder SM, Stancel GM. (1999). Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol.* 13, 806-811.
- [272] Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP. (2006). Effects of estradiol-17beta on expression of m RNA for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine* 30, 333-342.
- [273] Silva LA, Klein C, Ealy AD, Sharp DC. (2011). Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction* 142, 593-603.

- [274] Nishimura T, Dunk C, Lu Y, Feng X, Gellhaus A, Winterhager E, Rossant J, Lye SJ. (2004). Gap junctions are required for trophoblast proliferation in early human placental development. *Placenta* 25, 595-607.
- [275] Laws MJ, Taylor RN, Sidell N, DeMayo FJ, Lydon JP, Gutstein DE, Bagchi MK, Bagchi IC. (2008). Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development* 135, 2659-2668.
- [276] Nair RR, Jain M, Singh K. (2011). Reduced expression of gap junction gene connexin 43 in recurrent early pregnancy loss patients. *Placenta* 32, 619-621.
- [277] Wei P, Chen XL, Song XX, Han CS, Liu YX. (2004). VEGF, bFGF, and their receptors in the endometrium of rhesus monkey during menstrual cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 456-462.
- [278] Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. (2003). Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 126, 227-238.
- [279] Feranil JB, Isobe N, Nakao T. (2005). Immunolocalization of von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor during follicular atresia in the swamp buffalo ovary. *J. Reprod. Dev.* 51, 419-426.
- [280] Hickey M, Fraser IS. (2000). The structure of endometrial microvessels. *Hum. Reprod.* 3, 57-66.
- [281] Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. (2003). Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *J. Reprod. Dev.* 49, 181-192.

Anexo









EXPRESIÓN DE CD62 (L-Selectina) Y SU LIGANDO (CD34) EN EL EPITELIO UTERINO DE OVEJAS SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE SINCRONIZACIÓN

Ruiz-González F, García-Fernández RA¹, Sánchez MA¹, García-Palencia P¹, Sánchez B¹, González-Bulnes A², Flores JM¹
¹Dpto. Medicina y Cirugía Animal, Facultad Veterinaria, UCM; ²Dpto. Reproducción Animal, INIA.

Introducción

En la implantación ovina se ha especulado sobre si la unión de L-selectina (CD62) a sus ligandos activaría una cascada de adhesión que interviene en la formación de una unión estable entre el concepto y el epitelio uterino¹, permitiendo así una implantación eficaz que asegure la continuidad de la gestación. Los ligandos para la L-selectina son glicoproteínas entre las que se encuentran GlyCAM 1 y CD34². Trabajos previos describen la presencia de GlyCAM 1 en el útero ovino gestante³ y, basándonos en los mismos, nuestro estudio propone analizar la expresión de CD62 y un nuevo ligando, CD34, en ovejas gestantes durante los días 15, 17 y 21 post coito (pc). Estas ovejas habían sido sometidas previamente a dos tratamientos diferentes de sincronización del celo: análogos de prostaglandina (PG) y progestágenos (P4).

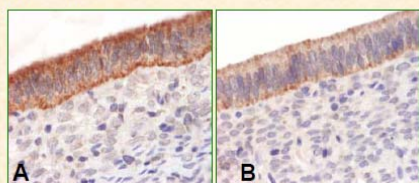


Figura 1.- CD62 día 17 pc; grupo PG (A) y grupo P4 (B).

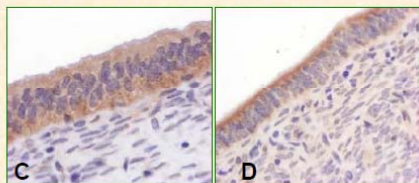


Figura 2.- CD34 día 17 pc; grupo PG (C) y grupo P4 (D).

Resultados y Discusión

La expresión de CD62, en el epitelio luminal, fue máxima el día 15 pc, en ambos grupos de tratamiento, para luego disminuir en los siguientes días estudiados. Esta reducción fue más evidente en el grupo tratado con P4 que en el grupo tratado con PG (Fig. 1, Fig. 3) aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

La expresión de CD34 fue máxima el día 15 pc, para luego disminuir ligeramente en los días 17 y 21 en el grupo P4, mientras que se mantenía elevada en el grupo PG durante todo el estudio. Por lo tanto, se observó una disminución de la expresión más acusada en el grupo P4 para CD34, de modo que la diferencia entre ambos grupos el día 21 pc fue evidente (Fig. 2, Fig. 4), aunque no estadísticamente significativa.

En resumen, la expresión de CD62 y su ligando fueron máximas en el día 15 pc para disminuir en los siguientes días estudiados, lo cual coincide con estudios previos realizados con CD62 y otros de sus ligandos¹. No obstante, la mayor reducción observada en la expresión de ambos factores en el grupo P4 podría indicar un efecto negativo de los progestágenos sobre la adhesión del embrión al epitelio uterino⁴.

Conclusiones

Nuestros resultados parecen indicar una menor eficiencia en la interacción materno-fetal durante el período peri-implantacional en los animales tratados con progestágenos.

La menor expresión de CD62 y CD34 en el grupo P4, contribuiría a explicar la menor viabilidad embrionaria en este grupo observada en estudios previos⁴, en comparación con el grupo PG.

Este estudio ha sido subvencionado con CYCIT AGL2005-02669

Material y Métodos

Las muestras se obtuvieron a partir de úteros de ovejas gestantes, durante los días 15, 17 y 21 pc, tras la sincronización del estro con progestágenos (n=13, grupo P4) o con análogos de prostaglandinas (n=13, grupo PG). Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica convencional utilizando un anticuerpo anti-CD62 para valorar la L-Selectina (mouse monoclonal [9H6] to CD62-L carboxyterminal end, Abcam) y un anticuerpo anti-CD34 (rabbit polyclonal to CD34, Abcam). La positividad se estudió valorando la intensidad de tinción del epitelio luminal (0 = negativa, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = intensa). Los datos obtenidos se analizaron mediante un estudio estadístico de Análisis de Varianza en función de los tratamientos y días.

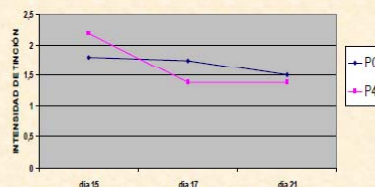


Figura 3.- Expresión de CD62 en el epitelio luminal en ambos grupos de tratamiento.

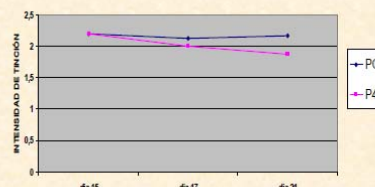


Figura 4.- Expresión de CD34 en el epitelio luminal en ambos grupos de tratamiento.

Bibliografía

- Spencer et al. (1999). Identification and characterization of glycosylation dependent cell adhesion molecule 1-like protein expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 60, 241-250.
- Baumhueter et al. (1994). Global Vascular Expression of Murine CD34, a Sialomucin-like endothelial Ligand for L-Selectin. *Blood*, 84(8), 2554-2565.
- Muniz et al. (2006). Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1-like protein and L-selectin expression in sheep interplacental and placental endometrium. *Reproduction*, 131, 751-761.
- González-Bulnes et al. (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction and Fertility Development*, 16, 421-435.





2011 Meeting

"Reproduction and the World's Future"

44th Annual Meeting

of the
Society for the Study of Reproduction
31 July–4 August 2011
Oregon Convention Center
Portland, Oregon

The 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction is supported by Award Number U13 HD036658-14 from the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development. The content is solely the responsibility of the organizers and does not necessarily represent the official views of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development or the National Institutes of Health.

The USDA National Institute of Food and Agriculture (NIFA) provides sustaining program support of the SSR Annual Meeting and the USDA NIFA Travel Fellowships.



President: Sally Perreault Darney, Ph.D.
(US EPA, Research Triangle Park, North Carolina)

Program Committee Chair: Jodi Anne Flaws, Ph.D.
(University of Illinois, Urbana, Illinois)

Local Arrangements Committee Chair: Jon Hennebold, Ph.D.
(Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon)

Science Education Outreach Coordinator: Mary Zelinski, Ph.D.
(Oregon National Primate Research Center, Beaverton, Oregon)



EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN UTERI AND CONCEPTUSES OF EWES

IRENE RUIZ-GONZALEZ, MEGAN A. MINTEN, KATHRIN A. DUNLAP, THOMAS E. SPENCER, FULLER W. BAZER

Center for Animal Biotechnology and Genomics, Dpt. of Animal Science, Texas A&M University, College Station.

Dpt. of Animal Medicine & Surgery, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid.



ABSTRACT

Toll-like Receptors (TLRs) are type I transmembrane proteins involved in the innate immune response to pathogen-associated molecular pattern (PAMP) molecules. They are pattern recognition receptors; which, after binding to their ligands, initiate signaling cascades by means of inflammation, phagocytosis, activation of complement, release of inflammatory cytokines, apoptosis and activation of transcription factors. TLRs are expressed primarily in antigen processing and presenting cells, although they have been detected in endothelial cells, fibroblasts and epithelium of multiple tissues including the ovary and uterus. Influences of the conceptus on the innate immune system have been described for humans and mice; therefore, we investigated differences in expression of TLRs in cyclic and pregnant ewes. Expression of TLR was analyzed in uterine endometria from ewes on Days 10, 12, 14 and 16 of the estrous cycle and endometria and conceptuses from ewes on Days 10, 12, 14, 16, 18 and 20 of pregnancy (n=4 or 5 ewes/day; Day 0 is the day of onset of estrus). Expression of mRNA for TLR1-TLR9 was quantified by real-time quantitative PCR. Relative quantification of gene expression was evaluated using a comparative CT method by subtracting the expression of alpha tubulin (TUBA1) CT value of each sample from the target gene CT value and data were analyzed to detect differences due to Day, Pregnancy Status and Day X Pregnancy Status interaction using PROC GLM of SAS. Expression of all TLRs were affected by Day ($P < 0.01$) except for TLR4 and TLR8 ($P < 0.05$). Expression of TLR2, TLR3, TLR6, TLR7 and TLR9 was different between cyclic and pregnant ($P < 0.01$) ewes and there were Day X Pregnancy Status effects for TLR1, TLR6, TLR7 ($P < 0.01$) and TLR3 and TLR9 ($P < 0.05$). Immunoreactive TLR7- and TLR8-like proteins were detected in uterine luminal epithelium, superficial glandular epithelium and stroma between Days 10 and 16 of the estrous cycle. Conversely, in pregnancy, endometrial expression of TLR7- and TLR8-like proteins decreased between Days 10 to Day 16, but then increased between Days 18 and 20 with abundant expression in the conceptus trophoblast. Additionally, intraepithelial lymphocytes present mainly in the deep uterine glands expressed TLR7 on all days studied. Results of this study indicate that TLRs are differentially expressed in most uterine cell types as well as resident immune cells during the estrous cycle, and that the pattern of expression is modified during the peri-implantation period of pregnancy in ewes.

INTRODUCTION

>Toll-Like Receptors (TLRs) are pattern-recognition receptors (PRRs) that modulate the innate immune response to pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs). This recognition results in a host response to the pathogen.

>TLRs are type I membrane glycoproteins that consist of an ectodomain with leucine rich (LRR) motifs and a cytoplasmic Toll-IL-1 receptor (TIR) domain.

>Sensors for intracellular pathogens:

TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9.

>Sensors for bacteria & fungi:

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR10.

>Dimers: between TLR1, TLR2, TLR6 and TLR10.

>Influence of steroid hormones; over TLRs expression has been demonstrated in human endometrium.

>Influence of conceptus over maternal innate immune system has been described in human and mice.

OBJECTIVES

•Expression of TLRs in cyclic ovine endometrium?

•Expression of TLRs in early pregnant ovine endometrium?

•Compartments expressing TLRs?

•Differential regulation when comparing days or status?

METHODOLOGY

qPCR.

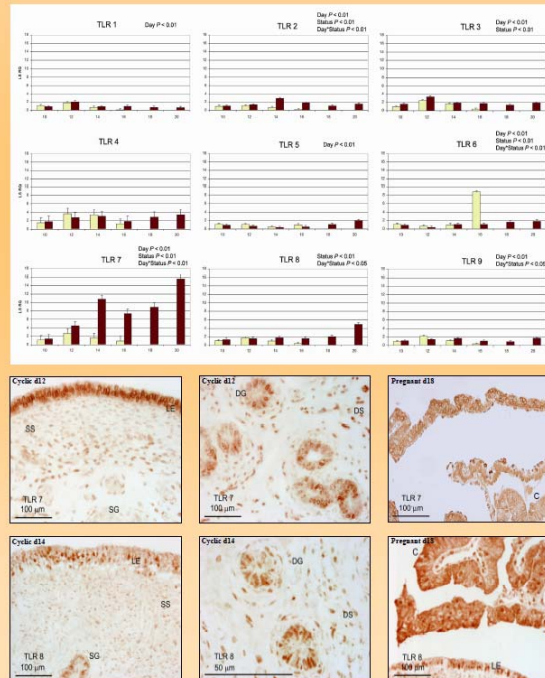
IHC (ABC) } Cyclic uteri (d10,12,14,16)

IHC (ABC) } Pregnant uteri (d10,12,14,16,18,20)

TLR7 (ab45371) Rabbit polyclonal to TLR7-Azide free, Abcam.

Anti-TLR8 Rabbit polyclonal, Thermo Scientific.

Uterine Compartments: Luminal epithelium LE, superficial stroma SS, superficial glandular epithelium SG, deep glandular epithelium DG, and deep stroma DS.



RESULTS

•mRNA expression of TLRs 1-3, 5-7 and 9 is significantly influenced by day of estrous cycle/pregnancy.

•mRNA expression of TLRs 2,3,6-8 is differentially expressed depending on status.

•IHC demonstrated high variability between animals from the same sample group.

•Immunoreactive TLR7 and TLR8 proteins were located in every endometrial compartment studied.

•Abundant immunorepression of TLR7 in stromal cells of pregnant ewes.

•Conceptuses from days 18 and 20 post mating expressed TLR7 and TLR8 proteins.

•Immune cells, mainly located among the deep glandular epithelium and deep stroma, were positive for TLR7 and TLR8.

CONCLUSIONS

•TLRs mRNA expression is regulated during ovine estrous cycle, probably by steroid hormones.

•TLRs mRNA expression is differentially regulated in ewes depending on cyclic or pregnant status.

•TLR7 and TLR8 proteins are differentially expressed by ovine endometrial cell types as days of estrous cycle/pregnancy advances.

•Potential role of endometrial stromal cells in the expression of TLR7 protein during early pregnancy, whereas TLR8 seems to be highly dependent on epithelial cells.

•Possible involvement of conceptus in the regulation of the maternal innate immune response during establishment of pregnancy.

REFERENCES

- Komaki et al (2011) Toll-like receptors and their role in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, In Press; doi:10.1016/j.anreprosci.2011.03.008
- King and Crinkley (2010) Oestrogen and Progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120 116-126
- Chang et al (2009) Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127 84-100.
- Ighal et al (2005) Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104 117-127.

Reproduction in Domestic Animals

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01852.x
ISSN 0936-6768

Endometrial Expression of IFNAR-1 and Oxytocin Receptor (OTR) is not Improved by Prostaglandin Analogues when Compared to Progestagens in Ewes

I Ruiz-González¹, MA Sánchez¹, RA García-Fernández¹, P García-Palencia¹, B Sánchez¹, CA Letelier², A González-Bulnes³ and JM Flores¹

¹Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad Veterinaria, UCM, Madrid, Spain; ²Facultad de Veterinaria, Universidad Central de Chile, Valdivia, Chile; ³Departamento de Reproducción Animal, INIA, Madrid, Spain

Contents

The objective of this study was to investigate differences on the endometrial immunoeexpression of type I IFN receptor subunit 1 (IFNAR1) and oxytocin receptor (OTR) during the time of maternal recognition of pregnancy in sheep, when oestrus is synchronized with either prostaglandin analogues (group PG) or conventional progestagens (group P). Plasma progesterone was measured from day 0 to 21 post-coitus (pc) (day 0 = day of oestrus). Immunohistochemistry was performed in samples of uterine horns from pregnant sheep on days 9pc, 13pc, 15pc, 17pc and 21pc to locate IFNAR1 and OTR expression in different endometrial compartments. Mean levels of plasma progesterone were different between treatments, obtaining higher levels in the PG group than in the P group ($p < 0.05$). Comparing days of pregnancy, IFNAR1 protein expression was different in the luminal epithelium (LE) ($p < 0.05$), while OTR was different in the LE and in the superficial glandular epithelium (SG) ($p < 0.05$). Temporal variation on the expression of both proteins from day 9pc to 21pc has been evidenced. IFNAR1 and OTR expression did not show significant differences between treatments. However, the response observed in the endometrium was highly inconsistent when prostaglandin analogues were used. Therefore, the protocol based on prostaglandin analogues still needs to be optimized before being considered as a better alternative to progestagens for oestrous synchronization in sheep.

Introduction

Management of reproductive cycle has to be conducted in the industry of animal production to optimize the useful life of livestock. Hormonal treatment constitutes the tool most utilized to synchronize ovulation. In the ewe, progestagens are commonly used for oestrous synchronization by mimicking the activity of the corpus luteum, although there is some controversy about the poor results that are being obtained in comparison with natural service (Gonzalez-Bulnes et al. 2005). Synchronization treatment with prostaglandin analogues is based on the induction of luteolysis and was introduced as a promising alternative to progestagens to be used during the breeding season (Inskeep 1973).

Most research conducted in sheep to compare both treatments has concluded that prostaglandin analogues lead to variable fertility rates (Barrett et al. 2002) and decreased reproductive performance (Olivera-Muzante et al. 2011). Disrupted pattern of the source of ovulatory follicles and disruption of normal luteogenesis (Liu et al. 2006) were also described when compared with progestagens. On the other hand, some authors have documented better results when synchronizing the animals with prostaglandin analogues, relating to

progestagens lower quality of preovulatory follicles (Gonzalez-Bulnes et al. 2005), deleterious effects on the functionality of the induced CL (Letelier et al. 2010), lower expression of oviductal and uterine oestrogen and progesterone receptors (García-Palencia et al. 2007) and worse viability of early embryos (Gonzalez-Bulnes et al. 2005). Therefore, no definitive conclusion about the efficiency of a treatment based on the use of prostaglandin analogues has yet been achieved.

In ruminants, embryo mortality and pregnancy loss is very high prior to or during implantation and maternal recognition of pregnancy (Thatcher et al. 1994; Roberts et al. 1996; Imakawa et al. 2004; Spencer et al. 2008), when conceptus must signal its presence to the maternal system to ensure maintenance of the CL and progesterone production (Spencer and Bazer 2002, 2004). Liberation of interferon-tau (IFN τ) is considered as the pregnancy recognition signal to prevent development of the luteolytic mechanism in ruminants (Spencer and Bazer 2004; Roberts et al. 2008). IFN τ , as a type I interferon, binds to a common receptor (IFNAR), constituted by two subunits (IFNAR1 and IFNAR2) (Rosenfeld et al. 2002), acting in a paracrine manner over the uterus to avoid the mechanism of luteolysis by interfering with the endometrial expression of oxytocin receptor (OTR) via oestrogen receptor-alpha (ER α) (Bazer et al. 2008, 2009). Lack of OTR expression prevents oxytocin-induced luteolytic pulses of PGF $_{2\alpha}$ (Kombé et al. 2003; Bazer et al. 2009).

The central role of OTR and oxytocin in the mechanism of luteolysis, in combination with the role of IFN τ through its receptor IFNAR in pregnancy instauration, led us to focus our interest in their study because of their direct involvement in embryo survival and establishment of pregnancy. Differential expression of IFNAR1 (Han et al. 1997; Imakawa et al. 2002) and OTR (Stevenson et al. 1994; Lamming et al. 1995) between cyclic and pregnant sheep has been documented, and therefore, we hypothesized that the influence of a synchronization treatment over the time for maternal recognition of pregnancy would be reflected in further changes on the expression of both receptors.

To our knowledge, there are no previous studies performed to compare the influence over the endometrium of these two different synchronization treatments during early implantation in sheep. We hypothesize that the synchronization treatments affect the uterine response to pregnancy and that differences in the expression of IFNAR1 and OTR could be used to demonstrate this effect. Therefore, the aim of this study is to assess

Elsevier Editorial System(tm) for Animal Reproduction Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Differences in Uterine Immunoexpression of PR, ER α and OTR when comparing Prostaglandin- to Progestagen-based Protocols for Ovine Estrus Synchronization.

Article Type: Research Paper

Keywords: Progesterone Receptor; Estrogen Receptor- α ; Oxytocin Receptor; immunohistochemistry; early pregnancy; ewe; estrus synchronization; progestagens; prostaglandin analogues.

Corresponding Author: Mrs. Irene Ruiz, DVM

Corresponding Author's Institution: Universidad Complutense of Madrid

First Author: Irene Ruiz, DVM

Order of Authors: Irene Ruiz, DVM; Maria A Sanchez, DVM, PhD; Pilar Garcia-Palencia, DVM, PhD; Belen Sanchez, DVM, PhD; Rosa A Garcia-Fernandez, DVM, PhD; Antonio Gonzalez-Bulnes, DVM, PhD; Juana M Flores, DVM, PhD

Abstract: The aim of this work was to study the endometrial response to the establishment of pregnancy when comparing two protocols for ovine estrus synchronization. Sixty-four adult Manchega ewes were synchronized with either conventional progestagens (P) or with prostaglandin analogues (PG) and mated. Uterine samples were obtained from pregnant animals (group P, n=24; group PG, n=25) on days 9 post coitus (pc), 13pc, 15pc, 17pc and 21pc. The endometrial response was assessed by immunohistochemical detection of Progesterone Receptor (PR), Estrogen Receptor- α (ER α) and Oxytocin Receptor (OTR) in different uterine cell compartments including luminal and glandular epithelium, stroma and myometrium. No significant differences in PR, ER α or OTR protein expression were obtained between treatments, although intensity of immunostaining was generally stronger in the prostaglandin-treated animals than in the P group. Moreover, there was interaction between day and treatment when assessing PR expression in the caruncular stroma ($P=0.027$) and myometrium ($P=0.000$). This was also observed when valorating ER α in the superficial stroma ($P=0.05$). Between days of pregnancy, differences were obtained in every compartment studied regarding to PR ($P<0.01$, with the exception of the superficial stroma, deep stroma and myometrium), ER α ($P<0.01$), and OTR ($P<0.05$, except deep glands, deep stroma and myometrium). This study evidences differences in the ovine endometrial response to early pregnancy when comparing progestagens to prostaglandin analogues for estrus synchronization. The immunohistochemical expression of steroid receptors in the PG group, which showed evident heterogeneity, indicates that prostaglandin analogues still need to be optimized before being considered as an alternative to progestagens.

Suggested Reviewers:

Differences in Uterine Immunoexpression of PR, ER α and OTR when comparing Prostaglandin- to Progestagen-based Protocols for Ovine Estrus Synchronization.

I. Ruiz-González^a, M.A. Sánchez^a, P.García-Palencia^a, B.Sánchez^a, R.A. García-Fernández^a, A.González-Bulnes^b, J.M. Flores^a.

^a*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad Veterinaria, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.*

^b*Dpto. de Reproducción Animal, INIA, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.*

Corresponding author: Irene Ruiz-González email: ireruiz@vet.ucm.es

Dpto. de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avenida Puerta de Hierro sn. 28040. Madrid, Spain.

Phone: 00 34 91 394 38 61

Fax: 00 34 91 394 38 08

Keywords: *Progesterone Receptor; Estrogen Receptor- α ; Oxytocin Receptor; immunohistochemistry; early pregnancy; ewe; estrus synchronization; progestagens; prostaglandin analogues.*

Abstract

The aim of this work was to study the endometrial response to the establishment of pregnancy when comparing two protocols for ovine estrus synchronization. Sixty-four adult Manchega ewes were synchronized with either conventional progestagens (P) or with prostaglandin analogues (PG) and mated. Uterine samples were obtained from pregnant animals (group P, n=24; group PG, n=25) on days 9 post coitus (pc), 13pc, 15pc, 17pc and 21pc. The endometrial response was assessed by immunohistochemical detection of Progesterone Receptor (PR), Estrogen Receptor- α (ER α) and Oxytocin Receptor (OTR) in different uterine cell compartments including luminal and glandular epithelium, stroma and myometrium. No significant differences in PR, ER α or OTR protein expression were obtained between treatments, although intensity of immunostaining was generally stronger in the prostaglandin-treated animals than in the P group. Moreover, there was interaction between day and treatment when assessing PR expression in the caruncular stroma ($P=0.027$) and myometrium ($P=0.000$). This was also observed when valorating ER α in the superficial stroma ($P=0.05$). Between days of pregnancy, differences were obtained in every compartment studied regarding to PR ($P<0.01$, with the exception of the superficial stroma, deep stroma and myometrium), ER α ($P<0.01$), and OTR ($P<0.05$, except deep glands, deep stroma and myometrium). This study evidences differences in the ovine endometrial response to early pregnancy when comparing progestagens to prostaglandin analogues for estrus synchronization. The immunohistochemical expression of steroid receptors in the PG group, which showed evident heterogeneity, indicates that prostaglandin analogues still need to be optimized before being considered as an alternative to progestagens.

Different influence of ovine estrus synchronization treatments over caruncular early angiogenesis.

I. Ruiz-González ^a, M.A. Sánchez ^a, R.A. García-Fernández ^a, P. García-Palencia ^a, B. Sánchez ^a, A. González-Bulnes ^b, J.M. Flores ^a.

^a *Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad Veterinaria, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.*

^b *Departamento de Reproducción Animal, INIA, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.*

Corresponding author: Irene Ruiz-González, email: ireruiz@vet.ucm.es

Dpto. de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avenida Puerta de Hierro sn. 28040. Madrid.

Phone: 00 34 91 394 38 62

Fax: 00 34 91 394 38 08

Keywords: *ewe, angiogenesis, early placentation, estrus synchronization.*

Short title: Treatment effect over early angiogenesis

Abstract

The present study compared two protocols for ovine estrus synchronization by assessing the caruncular angiogenic response to the establishment of pregnancy. The analysis consisted in the immunohistochemical evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) and Von Willebrand Factor (FVIII, vWF) in ovine caruncular stroma. A flock of thirty-eight adult ewes was divided in two groups and synchronized with either progestagens (Group P) or prostaglandin analogues (Group PG). Immunohistochemistry was performed in uterine samples obtained from pregnant ewes (P, n=15; PG, n=13) on days 15 post coitus (pc), 17pc and 21pc (day 0 = day of estrus). Each factor was assessed by total vascular density (TVD, total positive blood vessels/mm²), capillary vascular density (CVD, positive blood capillaries/mm²) and arteriolar vascular density (AVD, positive arterioles/mm²). Differences between treatments were demonstrated in VEGF-CVD ($P=0.045$), showing higher VEGF-positive vascular densities in the progestagens-group when compared to prostaglandin treated animals. Vascular CD31-expression was different within days 15pc and 21pc (TVD, $P=0.007$ and CVD, $P=0.014$), decreasing as pregnancy advanced in both groups. Observations pointed out in this study will add to further understanding of the influence of hormonal synchronization treatments over the angiogenic response in early pregnancy. Acknowledgment of these differences could be used to optimize the protocols for estrus synchronization in sheep.

1. Introduction

Livestock industries conduct management of the reproductive cycle in order to optimize animal productivity and overcome reproductive failure. Different assisted